SÉRIE A,
N° 4450

N° D'ORDRE
5298

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Alain COLLENOT

1re THÈSE : **Recherches comparatives sur l'inversion sexuelle par les hormones stéroïdes chez les Amphibiens.**

2e THÈSE : **L'emploi d'inhibiteurs du métabolisme (actinomycine et puromycine) dans l'analyse expérimentale des processus morphogénétiques.**

Soutenues le 27 Avril 1965 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN *Président*
JOST, HOUILLON *Examinateurs*

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1965

SÉRIE A,
N° 4450

N° D'ORDRE
5298

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Alain COLLENOT

1re THÈSE : **Recherches comparatives sur l'inversion sexuelle par les hormones stéroïdes chez les Amphibiens.**

2e THÈSE : **L'emploi d'inhibiteurs du métabolisme (actinomycine et puromycine) dans l'analyse expérimentale des processus morphogénétiques.**

Soutenues le 27 Avril 1965 devant la Commission d'examen.

MM. GALLIEN *Président*
JOST, HOUILLON *Examinateurs*

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

BRELOT ..... T Analyse supérieure.
PRENANT ..... T Anatomie et Histologie comparées.
GRASSÉ ..... T Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST ..... T Chimie organique.
WYART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER ..... T Zoologie.
MANGENOT ..... T Biologie végétale (Orsay).
AUGER ..... T Physique quantique et relativité.
MONNIER ..... T Physiologie générale.
PIVETEAU ..... T Paléontologie.
ROCARD ..... T Physique (E.N.S.).
CARTAN ..... T Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE ..... T Chimie générale.
N. ..... T Géométrie supérieure.
COULOMB ..... T Physique du globe.
Mlle COUSIN ..... T Biologie anim. (S.P.C.N.)
CHRÉTIEN ..... T Chimie minérale.
BOCQUET ..... T Zoologie.
KASTLER ..... T Physique (E N S.)
EPHRUSSI ..... T Génétique.
RIVIÈRE ..... T Géologie (S.P.C.N.) et sédim. (Orsay).
GAUTHERET ..... T Biologie végét. (P.C.B.).
LUCAS R. ..... T Recherches physiques.
THOMAS A. ..... T Biologie cellulaire.
ARNULF ..... T Optique appliquée.
MORAND. ..... T Physique Enseignement.
SOLEILLET ..... T Physique. (P.C.B.)
FORTIER ..... T Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH ..... T Zoologie.
QUENEY ..... T Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN ..... T Embryologie
EICHHORN ..... T Botanique.
DE CUGNAC ..... T Biologie végét. (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS ... T Chimie-Physique.
THELLIER ..... T Physique du Globe.
L'HÉRITIER ..... T Biologie générale (Orsay).
GRIVET ..... T Radioélectricité (Orsay).
PONCIN ..... T Mécanique générale.
DUBREIL ..... T Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET ..... T Chimie organique.
CAGNIARD ..... T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ..... T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER ..... T Micropaléontologie.
JUNG ..... T Géologie.
TRILLAT ..... T Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN ..... T Chimie organique structurale.
JACQUINOT ..... T Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY ..... T Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ..... T Théories physiques.
AMIEL ..... T Chimie génér.
HOCART ..... T Minéralogie et Cristallographie.
J.-P. MATHIEU .... T Physique (Optique.)
COUTEAUX ..... T Cytologie.
MAY ..... T Zoologie.
CHOQUET ..... T Théor. des fonct. et topologie.
FELDMANN ..... T Biologie végétale marine.
GUINIER ..... T Physique des solides (Orsay).
JOST ..... T Physiol. comparée.
FORTET ..... T Calcul des probabilités et Phys. math.
SCHWARTZ ..... T Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD ..... T Physiologie Végétale.
MALAVARD ..... T Aviation (Tech. aéronaut).
NORMANT ..... T Synthèse organique.
BENARD ..... T Chimie minérale.
BUVAT ..... T Botanique (E.N.S.)
DUGUE ..... T Statistiques Math.
SOULAIRAC ..... T Psychophysiologie.
ULRICH ..... T Physiol. végétale appl.
MARÉCHAL ..... T Optique théorique et appl.
KIRRMANN ..... T Théories chimiques.
CHADEFAUD ..... T Botanique.
Mlle LE BRETON .. T Physiologie de la nutrition.
LELONG ..... T Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS ..... T Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN ..... T Topologie algébrique
FRANÇON. ..... T Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD ..... T Géographie physique et Géologie.
GODEMENT ..... T Mathématiques (M.G.P.).
PISOT ..... T Technique mathématique de la physique.
ROCH ..... T Géologie.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Schatzmann	T	Astrophysique.
Termier	T	Géologie générale.
Zamansky	T	Mathématiques générales.
Lennuier	T	Physique (M.G.P.).
Rizet	T	Génétique (Orsay).
Routhier	T	Géologie appliquée.
Mme Tonnelat	T	Physique théorique.
Dixmier	T	Mathématiques (M.P.C)
Souchay	T	Chimie générale
Aigrain	T	Electrotechnique générale.
Brusset	T	Chimie systématique.
M. Lévy	T	Physique théorique des hautes énergies. (Orsay).
Mme Chaix	T	Chimie biologique.
Mme Hurel-Py	T	Biologie végétale (P.C.B).
Pannetier	T	Chimie générale.
Brun	T	Mécanique des fluides I.
Lederer	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme Dubreil	T	Mathématiques (Agrégation).
Mme Lelong	T	Mathémat. II (E.N.S.)
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.).
Cotte	T	Physique électricité.
Dubois J.-E.	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.).
Michel A.	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Energétique générale.
Rouault	T	Electricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz	T	Chimie physique.
Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie végétale.
Castaing	T	Phys. II Thermo (Orsay)
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Mme Charniaux-Cotton	T	Evolution des êtres organisés.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique (Orsay).
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie (P.C.B.).
Dodé	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.
Guinochet	T	Biologie vég. S.P.C.N. (Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie S.P.C.N.
Chevalley	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain P.	T	Mécanique théorique des fluides.
Lucas G.	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Phys. des particules fondamentales (Orsay).
Bricard	T	Météorologie et physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psycho-physiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
M. Julia	T	Etudes des moléculaires complexes.
Lender	T	Biologie animale (S.P.C.N.) Orsay.
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemee	T	Ecologie Vég. (Orsay).
Guerin	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay)
Chatelet M.	T	Chimie (P.C.B.).
Jean.	T	Physique nucléaire (Orsay)
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissieres	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodynamique et Mécan. physique.
Ellenberger	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
Franc.	T	Biologie animale (P.C.B.)
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski	T	Physiologie chimique.
Acher.	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biologie animale (P.C.B.).
Beaumont		Biologie animale (S.P.C.N.).
Blamont	T	Géophysique ionosphère.
Boureau	T	Botanique.
Curie D.	T	Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Freon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat.	T	Calcul des Probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S.P.C.N.).
Magnan	T	Physique électricité.
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théor. et la Phys. nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat	T	Méc. analytique et Méc. céleste.
Mlle Viel	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécan. physique et expérimentale.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
Brochard	T	Physique (P.C.B.) (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).

Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géologie dyn.
Comolet		Mécanique des Fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue	T	Physique de l'Exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale (P.C.B.).
Jullien J.		Chimie SPCN (Orsay).
Malgrange	T	Technique mathématique de la Phys. (Orsay).
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique (E.N.S.) (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques ENS féminines.
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique SPCN.
Amat	T	Physique PCB.
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Phys. Nucléaire et radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer.)
Bruhat	T	Mathématiques MPC.
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabral	T	Physique MGP (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématique Propé.
D'Espagnat	T	Physique théorique (Orsay).
Furon	T	Géologie SPCN.
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale PCB.
Guilbert		Physique (CUS Orléasn)
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie PCB.
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétographie.
Roseau	T	Méca. théor. des fluides.
Roubine	T	Electronique.
Silber	T	Chimie PCB.
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories Physiques.
Herve	T	Mathématiques.
Neron	T	Mathémat. MPC (Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique MPC.
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Physique théorique (Orsay).
Gourdin		Phys. Théor. des Hautes-Energies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. Exp. des Hautes-Energies (Orsay).
Nataf	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
Echalier		Biologie animale PCB.
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret		Physiologie végét. Orsay.
Dars		Géologie struc. et Geol. appliquée.
Camefort	T	Botanique ((agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquiere		Electronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (CSU Orléans).
Malliavin	T	Mathématique propé. (Orsay).
Gaudemar		Chimie Propéd.
Perez y Jorba		Phys. Exp. des Hautes énergies (Orsay).
David	T	Chimie (Agrég. Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérimentale.
Lazard		Math. M.P.C.
Morel Pierre		Physique M.P.C.
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie M.P.C.
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique C.P.E.M.
Rio		Chimie C.P.E.M.
Jauzein		Géologie. E.N.S.
Prevost Georges		B.V. C.P.E.M.
Favard P.		B.A. C.P.E.M.
Vilkas		Chimie C.P.E.M.
M^lle Ficini		Chimie C.P.E.M
Lequeux		Astronomie.
Cohen Tannoudji		Physique M.P.C.
Tavernier		Physique C.P.E.M.
M^me Roizen		Physique C.P.E.M.
Durand M.		B.A. S.P.C.N.
Pascaud		Physiologie.
M^me Petit		B.A. C.P.E.M.
Brousse		Géologie Orsay
Cagniac		Physique agrégation Orsay.
Leberre		Zoologie (Orsay).
Scheffer		Microbiologie (Orsay).
De Gennes		Physique des solides (Orsay).
Riou		Physique nuclé. exp. Orsay.
Clauser		Chimie biolo. Orsay.
Chevalier		Physio. animale Orsay.
Jancovici		Physique atomique Orsay.
Falk-Vairant		Physique nucléaire Orsay.
Fetizon		Chimie propé. Orsay.
Cerf		Mathématiques Orsay.

Secrétaire Général..... R. Poullain.

SOMMAIRE.

Pages

AVANT-PROPOS 6

INTRODUCTION 7

MATÉRIEL ET TECHNIQUES 12

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES 20

Première partie. — TRAITEMENTS PAR LE BENZOATE D'ŒSTRADIOL ET LE PROPIONATE DE TESTOSTÉRONE 20

— Action de l'hormone femelle (benzoate d'œstradiol) .. 22

— Action de l'hormone mâle (propionate de testostérone). 53

— Conclusions 70

Deuxième partie. — ANALYSE COMPARATIVE DES EFFETS DU BENZOATE D'ŒSTRADIOL, DU DIÉTHYLSTILBŒSTROL ET DU DIMÉTHYLSTILBŒSTROL 77

— Action comparée du benzoate d'œstradiol, du diéthylstilbœstrol et du diméthylstilbœstrol chez *Pleurodeles waltlii* 78

— Action comparée du benzoate d'œstradiol et du diéthylstilbœstrol chez *Pelobates cultripes* 83

— Conclusions 86

Troisième partie. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE Δ^5-3β-HYDROXYSTÉROÏDE DÉSHYDROGÉNASE DANS LES GONADES DES LARVES DE *Pleurodeles waltlii* 88

Quatrième partie. — EVOLUTION DES GONADES DES ANIMAUX TRAITÉS PAR LE BENZOATE D'ŒSTRADIOL 94

— *Pelobates cultripes* 95

— *Triturus alpestris* 104

— Conclusions 115

DISCUSSION GÉNÉRALE 119

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 125

RÉSUMÉ 126

SUMMARY 128

BIBLIOGRAPHIE 130

AVANT-PROPOS.

Les recherches exposées dans ce travail ont été exécutées au Laboratoire d'Embryologie de la Faculté des Sciences de Paris.

M. le Professeur GALLIEN, Membre de l'Institut, m'a proposé ce sujet qui est la poursuite de ses propres travaux et auquel il aurait aimé se consacrer lui-même. Je suis heureux de pouvoir lui exprimer ici toute ma reconnaissance pour ses conseils, ses critiques et ses encouragements et pour la formation scientifique que j'ai reçue dans son Laboratoire.

Je remercie M. le Professeur COURRIER, Membre de l'Institut, qui a accepté de présenter mes notes préliminaires.

Messieurs les Professeurs JOST et HOUILLON ont bien voulu participer à mon Jury de Thèse ; je les en remercie.

Je remercie M. le Docteur EMMENS et les Laboratoires qui m'ont fourni gracieusement les différentes hormones utilisées.

A mes amis et au personnel technique du Laboratoire d'Embryologie dont l'aide m'a été précieuse j'exprime mon amicale gratitude.

Je suis reconnaissant à la Société Zoologique de France qui a accepté de publier ce travail dans ses Mémoires (tome 33, 1965).

INTRODUCTION.

De nombreuses recherches, poursuivies principalement depuis 1920, ont été consacrées à la différenciation sexuelle des Amphibiens. Les résultats qu'elles ont apportés ont permis de dégager une conception du phénomène qui est maintenant classiquement admise : la différenciation de l'un ou de l'autre sexe s'effectue à partir d'une gonade indifférenciée et fondamentalement bisexuée, celle-ci est constituée de deux territoires, l'un superficiel, le cortex, qui contient les cellules germinales primordiales, l'autre profond, la médulla. Tous deux sont d'origine somatique ; l'un dérive de l'épithélium cœlomique, l'autre du blastème néphrétique. La différenciation est le résultat de la compétition de ces deux territoires et de la dominance de l'un ou de l'autre selon le sexe génétique. Le cortex est de valeur prospective femelle et la médulla est de valeur prospective mâle. Cette compétition traduit en fait un antagonisme cortico-médullaire qui est lui-même contrôlé par la balance génique sexuelle de chaque individu, déterminée au moment de la fécondation.

Dans ce schéma, il convient donc de distinguer deux ordres de phénomènes, d'une part la détermination génétique du sexe de l'individu, d'autre part l'expression de cette détermination génétique au cours de la différenciation sexuelle des gonades puis, plus tardivement, au cours de celle des caractères sexuels somatiques.

Les efforts des expérimentateurs ont tendu principalement vers la connaissance de l'enchaînement des processus qui relient le génotype au phénotype sexuel. Des interventions expérimentales variées ont permis de modifier le cours de la différenciation sexuelle, conduisant à la formation de gonades intersexuées ou de gonades dont le sexe phénotypique est opposé au sexe génétique de l'individu. A cet égard, la morphogenèse des gonades ne diffère pas sensiblement de celle des autres organes dont les traits caractéristiques sont déterminés génétiquement mais dont la réalisation est susceptible d'être modifiée sous l'action de facteurs épigénétiques.

Parmi les interventions expérimentales capables de modifier le déroulement de la différenciation sexuelle des gonades celle qui consiste à administrer des hormones sexuelles stéroïdes pendant la vie larvaire a été le plus souvent utilisée à partir de 1935. Elle a donné lieu, dans les différentes classes des Vertébrés, à de très nombreux travaux qui ont fait l'objet de plusieurs mises au point (Ponse, 1949 ; Colloque International du CNRS, 1950 ; Gallien, 1959 ; Burns, 1961 et Foote, 1964), aussi nous bornerons-nous à rappeler ceux qui concernent le plus directement notre travail.

Chez les Amphibiens, PADOA, en 1936, a obtenu la masculinisation de têtards de *Rana esculenta* après un traitement avec de la folliculine. L'auteur désignait cette masculinisation comme un effet paradoxal indiquant par là l'effet orthodoxe qu'il espérait obtenir en administrant un traitement à base d'hormone femelle. En 1937, GALLIEN a obtenu l'inversion complète du sexe chez *Rana temporaria* en masculinisant les gonades des femelles génétiques par l'administration de propionate de testostérone pendant la vie larvaire.

S'il était acquis, à la faveur de ces résultats, que les hormones sexuelles stéroïdes intervenaient dans la différenciation des gonades, il a cependant fallu, par la suite, reconnaître qu'elles ne mimaient pas exactement l'action des inducteurs sexuels embryonnaires dont les expériences de parabiose ou les greffes de gonades embryonnaires avaient permis de concevoir l'existence (BURNS, 1925 a et b, 1930, 1931, 1935 ; HUMPHREY, 1928, 1931 ; WITSCHI, 1931, 1936, 1937 ; WITSCHI, GILBERT et ANDREW, 1931 ; WITSCHI et MC CURDY, 1929), à l'instar des free-martins naturels analysés chez les bovidés par LILLIE (1917). Les recherches ont été poursuivies sur un grand nombre d'espèces d'Amphibiens et certains aspects de l'action des hormones sexuelles ont été précisés.

Les modalités de l'obtention de l'effet paradoxal ont été analysées (GALLIEN, 1940 b, 1941 et PADOA, 1942). L'effet paradoxal est le résultat de l'action des fortes concentrations de l'hormone femelle (œstrone ou œstradiol) administrées qui entraînent la masculinisation des gonades des têtards de *Rana esculenta* ou de *R. temporaria* alors que des concentrations plus faibles provoquent la féminisation, non permanente, des gonades des mâles génétiques.

L'extension des expériences à d'autres espèces d'Amphibiens a montré que celles-ci ne réagissent pas de la même manière que les espèces appartenant à la famille des *Ranidae*.

D'une part, un traitement par les hormones femelles entraîne, sans qu'il soit possible de mettre en évidence l'existence d'un effet paradoxal, la féminisation totale des gonades chez *Ambystoma* sp. (*punctatum*) BURNS, 1938 ; (*tigrinum*) ACKART et LEAVY, 1939 ; (*opacum*) FOOTE C. L., 1940 et 1941), *Hynobius retardatus* (HANAOKA, 1939 - 1941 a), *Hynobius nebulosus* (ASAYAMA et MIYAMORI, 1957 a), *Pleurodeles waltlii* (GALLIEN, 1950 b et 1954 b) et *Xenopus laevis* (WITSCHI et ALLISON, 1950 ; GALLIEN, 1953). La féminisation n'est que partielle chez *Bufo americanus* (CHANG, 1955), *Discoglossus pictus* (GALLIEN, 1950 a) et *Alytes obstetricans* (WITSCHI, 1951 b).

D'autre part, l'hormone mâle est masculinisante chez les *Ranidae* même à des concentrations très faibles (MINTZ et WITSCHI, 1946 ; MINTZ, 1948) et chez les *Hylidae* ; elle est inactive chez *Bufo americanus* et *Discoglossus pictus* ou bien elle exerce une action pathogène sur la différenciation du mésonéphros provoquant secondairement une féminisation des gonades qui résulte de l'inhibition différentielle des deux composants fondamentaux de l'ébauche gonadique : le cortex et la médulla. Ce phénomène a été observé chez

Hynobius retardatus (Hanaoka, 1941 b), *Hynobius nebulosus* (Asayama et Amanuma, 1957), *Ambystoma* sp. (Foote C. L., 1941 ; Mintz, 1947 et Bruner, 1952), *Triturus pyrrhogaster* (Asayama et Matsuzaki, 1958), *Triturus cristatus carnifex* (Chieffi, 1962) et *Pleurodeles waltlii* (Gallien, 1950 c, 1954 b).

En outre, il a été démontré (Mintz et Gallien, 1951, 1954) que l'hypophyse n'intervient pas dans la manifestation de cet effet paradoxal, de même que l'hypophysectomie n'altère pas la différenciation sexuelle des larves de *Rana pipiens* (Mintz et Foote, 1947 ; Chang et Witschi, 1955 a), de *Pleurodeles waltlii* (Mintz et Gallien, 1951, 1954) ou de *Rana temporaria ornativentris* (Iwasawa, 1961).

Les résultats qui précèdent ont été obtenus à la suite de l'administration d'œstrone, d'œstradiol ou de testostérone, mais d'autres substances ont aussi été utilisées. Certaines sont des stéroïdes, d'autres sont d'une nature chimique différente. Nous citerons les principaux résultats qui ont été obtenus.

Chez *Rana esculenta*, Padoa (1942) a montré que la progestérone masculinise la gonade : le même résultat a été obtenu chez *Rana dalmatina* (Vannini, 1945, 1948) et *Rana sylvatica* (Witschi, 1950).

L'éthinyl-testostérone, ou prégnéninolone, masculinise les gonades chez *Rana temporaria* (Jost, 1943) et *Rana pipiens* (Eversole et d'Angelo, 1943) alors qu'elle provoque leur féminisation partielle chez *Discoglossus pictus* (Gallien, 1948) et qu'elle exerce, chez *Pleurodeles waltlii*, le même effet d'inhibition sur la gonade que la testostérone (Gallien, 1951).

La désoxycorticostérone exerce une action féminisante chez *Rana esculenta* (Padoa, 1942), *Rana dalmatina* (Vannini, 1945, 1950 a), *Hynobius nebulosus* (Asayama et Yamamoto, 1951) et *Triturus pyrrhogaster* (Asayama, 1953) et une action masculinisante chez *Rana sylvatica* (Witschi et Chang, 1950) et *Rhacophorus schlegelii* (Iwasawa, 1958 a).

Asayama (1955) a administré, chez *Hynobius nebulosus*, les hormones hypophysaires ACTH et ICSH et Iwasawa (1958 c) a fait de même chez *Rhacophorus schlegelii* avec FSH et LH, les résultats qu'ils ont obtenus nous paraissent difficiles à interpréter et ne permettent pas d'affirmer que ces substances ont exercé une action sur la différenciation des gonades chez les espèces utilisées alors que chez *Bufo arenarum*, Burgos et Pisanò (1962) ont obtenu la masculinisation des gonades après l'injection de FSH et leur féminisation après l'injection de LH.

Enfin, la thiourée administrée chez *Hynobius nebulosus* par Asayama et Miyamori (1957 b) et chez *Bufo vulgaris formosus* par Iwasawa (1957) exerce une action inhibitrice sur la différenciation des gonades alors qu'elle les masculinise chez *Rhacophorus schlegelii* (Iwasawa, 1955). Cette dernière action ne semble pas être spécifique de la thiourée mais plutôt des antithyroïdiens car chez la même espèce le méthylmercaptoimidazole a la même action (Iwasawa, 1958 b).

Si nous prenons en considération les résultats des traitements effectués à l'aide de l'œstrone, de l'œstradiol et de la testostérone nous constatons que les espèces éprouvées peuvent être réparties en deux groupes selon le type de leur réaction à ces traitements :

1) Les espèces appartenant aux familles des *Ranidae* et des *Hylidae* (Anoures supérieurs) masculinisées par l'hormone mâle et chez lesquelles le benzoate d'œstradiol entraîne la féminisation, non permanente, aux faibles concentrations et la masculinisation (effet paradoxal) aux fortes concentrations ;

2) Les espèces appartenant à l'ordre des Urodèles et, parmi les Anoures, aux genres *Xenopus, Bufo, Discoglossus* et *Alytes*, chez lesquelles le benzoate d'œstradiol exerce une action féminisante et le propionate de testostérone est sans action ou bien exerce une action féminisante (effet paradoxal).

Une telle répartition permet de dégager l'idée que des facteurs liés à la taxinomie jouent un rôle dans la réponse d'une espèce donnée aux traitements hormonaux (Gallien, 1950 e, 1954 a). Dans le but de préciser cette hypothèse, nous avons entrepris des recherches comparatives dont les résultats font l'objet de la première partie de notre exposé où nous étudions successivement, chez plusieurs espèces d'Amphibiens, l'action, sur la différenciation sexuelle des gonades, de l'hormone femelle puis de l'hormone mâle administrées pendant la vie larvaire.

Chez *Rana sylvatica*, Witschi (1948) a démontré l'action féminisante de l'œstradiol et l'action nulle du diéthylstilbœstrol alors que dans d'autres classes de Vertébrés cette dernière substance a la même action féminisante que l'œstradiol. Afin de déterminer si le résultat obtenu par Witschi est propre à la classe des Amphibiens ou bien seulement à la famille des *Ranidae*, nous avons comparé l'action des deux substances chez *Pelobates cultripes* et *Pleurodeles waltlii*. Les résultats de ces recherches font l'objet de la seconde partie de notre exposé.

L'analyse des résultats obtenus à la suite des traitements par les hormones sexuelles stéroïdes chez les Amphibiens et chez d'autres classes de Vertébrés, notamment chez les Oiseaux ou chez l'Opossum, ne permet pas de décider si les inducteurs sexuels embryonnaires et les hormones sexuelles stéroïdes sont identiques ou bien si ces dernières interviennent seulement dans la différenciation sexuelle des gonades des animaux traités comme des facteurs épigénétiques altérant le mécanisme antagoniste cortico-médullaire initial.

Par ailleurs, les tentatives d'isolement et d'identification de stéroïdes sexuels dans les gonades à des stades précoces du développement ont permis de démontrer la présence d'œstradiol dans les ovaires embryonnaires du Poulet (Gallien et Le Foulgoc, 1958) et dans les ovaires juvéniles de *Xenopus laevis* (Gallien et Chalumeau-Le Foulgoc, 1960) mais seulement à des stades postérieurs à ceux de la différenciation sexuelle des gonades. Dans ces condi-

tions, nous avons entrepris, grâce à l'emploi d'une technique qui permet de déceler la présence d'une enzyme importante de la biosynthèse des hormones stéroïdes, une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase, l'étude histochimique de la différenciation des gonades chez des larves de *Pleurodeles waltlii* normales et traitées par le benzoate d'œstradiol. C'est cette étude que nous rapportons dans la troisième partie.

Enfin, dans la quatrième partie, nous analysons les résultats que nous avons obtenus, chez *Triturus alpestris* et *Pelobates cultripes*, lorsque des animaux traités par le benzoate d'œstradiol pendant la vie larvaire sont élevés jusqu'à l'âge adulte. Nous avons ainsi constaté que la féminisation observée à la métamorphose n'est pas stable et que les individus féminisés tendent à recouvrer des gonades dont le phénotype sexuel est conforme à leur sexe génétique.

Nous terminerons notre exposé par une discussion générale des résultats que nous avons obtenus et dont certains ont fait l'objet de notes préliminaires (Gallien et Collenot, 1958, 1960 ; Collenot, 1961, 1964).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

I. — Espèces utilisées.

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé des larves appartenant aux espèces d'Amphibiens suivantes :

Amphibiens Anoures :

Famille des *Discoglossidae* : *Bombina variegata* L.
Famille des *Pelobatidae* : *Pelobates cultripes* Cuvier
Pelodytes punctatus Daudin

Amphibiens Urodèles :

Famille des *Salamandridae* : *Salamandra salamandra* L.
Triturus alpestris Laurenti
Triturus helveticus Razoumowsky.

Au cours d'expériences à caractère comparatif, nous avons été amené à utiliser également :

Rana temporaria L. (Famille des *Ranidae*)
et *Pleurodeles waltlii* Michah. (Famille des *Salamandridae*).

Toutes ces espèces, à l'exception de la dernière, sont indigènes (Angel, 1946).

II. — Obtention des pontes.

Il a été démontré par Kuschakewitsch (1910), Hertwig (1921) et Witschi (1924) que la surmaturité des œufs peut entraîner des modifications sensibles dans la différenciation des gonades et conduire à des altérations de la *sex-ratio* dues à un excédent de mâles. Il est donc important d'expérimenter sur des larves issues de pontes obtenues dans des conditions se rapprochant le plus possible des conditions naturelles. Les pontes de *Pelobates cultripes* et *Pelodytes punctatus* ont été pêchées dans des mares des environs de Toulouse, un ou deux jours après la fécondation et ramenées à Paris dans de l'eau dont la température a été maintenue entre 14 et 18° C.

Les pontes de *Rana temporaria* ont été recueillies au laboratoire. Elles provenaient d'individus capturés l'automne précédent dans les Vosges et expédiés au laboratoire. Là, ils se sont accouplés et reproduits.

Salamandra salamandra est une espèce ovovivipare : les larves provenaient de femelles, capturées en forêt de Marly durant l'automne précédent, maintenues au laboratoire dans un terrarium et

qui ont pondu au printemps ou bien de femelles sacrifiées aussitôt après leur capture pendant l'automne et dont les oviductes ont été ouverts afin de recueillir les larves bien avant le moment où elles sont mises au monde par la mère. Cette méthode nous a permis d'obtenir des larves dont le stade de développement était plus précoce que celui qui est atteint au moment de la ponte naturelle.

En ce qui concerne les autres espèces, des élevages sont maintenus au laboratoire. Les conditions de vie de *Pleurodeles waltlli* au laboratoire sont connues et maîtrisées (Gallien, 1952) et il est aisé d'obtenir, au moment voulu, à l'exclusion des mois d'été, l'accouplement puis la ponte d'un grand nombre d'œufs fécondés de même stade.

Les deux espèces *Triturus alpestris* et *T. helveticus* sont maintenues dans des conditions d'élevage identiques. Celles-ci consistent en des bacs en ciment spacieux dont le fond est recouvert de graviers et garni de plantes aquatiques ; un filet d'eau courante permet le renouvellement constant de l'eau. Dans chaque bac, sont groupés une douzaine de couples de la même espèce nourris abondamment de larves de chironomes. Au mois de Décembre pour *T. helveticus* et de Mars pour *T. alpestris* débute la période de ponte qui s'échelonnera sur 2 à 3 mois. Chaque femelle ne pond que quelques œufs chaque jour. Ceux-ci sont fixés au moment de la ponte, par la gangue qui les entoure, sur des plantes aquatiques dans des feuilles pliées ou agglutinées. Les œufs sont récoltés chaque jour ou tous les deux jours. Si la récolte est effectuée assez précocement après la ponte, il devient possible de surveiller le développement des embryons et de le ralentir ou l'accélérer, à volonté, en plaçant ceux-ci dans des enceintes calorifugées où la température de 12° C ou de 18° C est constante. De cette manière, on peut obtenir un assez grand nombre de larves qui atteignent toutes au même moment le stade de la prise de nourriture et avec lesquelles peuvent être mises en route, au même moment, une ou plusieurs séries expérimentales. Il faut préciser cependant que les larves d'une même série expérimentale ne proviennent pas de la même femelle.

L'élevage au laboratoire de *Bombina variegata* est aisé, mais il est difficile d'obtenir spontanément l'accouplement et la ponte. Nous avons dû effectuer des injections, dans la cavité abdominale, d'hypophyses fraîches broyées de *Rana temporaria* sur de nombreux couples pour obtenir quelques pontes dont le nombre moyen des œufs (55) était moins élevé que celui indiqué pour les pontes naturelles (une centaine d'œufs selon Angel, 1946).

III. — Elevages.

Les larves ont été élevées dans des cuvettes en matière plastique. La densité des élevages était en moyenne de 4 à 5 animaux par litre, soit 20 à 25 animaux pour une cuvette contenant 5 litres d'eau du robinet.

Witschi (1929 b), Piquet (1930) et Uchida (1937) ont montré que l'élevage jusqu'à la métamorphose de larves de *Rana sylvatica, R. temporaria, Bufo bufo* ou *Hynobius retardatus* à des températures basses ou élevées se traduisait par une altération de la *sex-ratio* et par des modifications de la différenciation des gonades. Une température élevée, de 25° C par exemple, provoque la masculinisation des femelles génétiques alors qu'une température de 10° C provoque la féminisation des mâles génétiques. Il était donc souhaitable de pouvoir préciser les conditions de température dans lesquelles se sont déroulées des expériences.

Les élevages ont été réalisés à la température du laboratoire comprise entre 18 et 20° C. Nous devons cependant rappeler les cas, peu fréquents, où le développement de quelques larves a dû être ralenti par un séjour à 12° C. Mais ce dernier n'a jamais dépassé 4 à 5 jours.

L'alimentation des larves est différente selon qu'il s'agit de Batraciens Anoures ou Urodèles. Les larves des Urodèles sont carnivores. Elles capturent des proies vivantes qui peuvent être, pour les très jeunes larves, des daphnies de petite taille ou des larves d'Artemia à l'éclosion et pour les larves plus âgées, juqu'à la métamorphose, des grosses daphnies, des *Tubifex* hachés, ou bien des larves de Chironomes. Une alimentation abondante est nécessaire chez ces espèces où les mutilations et le cannibalisme peuvent provoquer une mortalité importante enlevant toute signification aux résultats d'une expérience.

Les larves herbivores des Anoures ont été approvisionnées chaque jour avec de la salade verte ou des épinards bouillis et, de temps en temps, des morceaux de foie cru de bœuf ou d'amphibien.

Dès que les deux membres antérieurs apparaissaient chez les têtards des Anoures ou bien les premiers signes de la régression des branchies chez les Urodèles, les animaux étaient sortis des cuvettes d'élevage et groupés dans des cuvettes inclinées de telle sorte que le fond pouvait être recouvert d'eau sur la moitié de sa surface et d'ouate humide sur l'autre moitié. Là, les animaux achevaient leur métamorphose et lorsque la queue ou les branchies avaient totalement régressé, ils étaient ou bien sacrifiés, ou bien placés dans des terrariums ou des cuvettes d'élevage.

Le but de ce travail était tout d'abord de rechercher les conditions expérimentales de l'inversion phénotypique du sexe chez les différentes espèces citées et ensuite, les conditions d'inversion étant connues, d'élever les animaux inversés pour tenter d'en obtenir une descendance.

Parmi les espèces de Batraciens Anoures, nous avons réussi à élever après la métamorphose *Bombina* et *Pelobates* au delà de l'âge de 3 ans. Nous avons échoué dans l'élevage de *Pelodytes*. Cette espèce a refusé toute alimentation après la métamorphose. Deux mois après la mise en route des élevages, nous avons dû sacrifier les

quelques animaux survivants. Les animaux, très éprouvés par le jeûne, étaient dans un état de dénutrition avancée qui s'est répercuté sur l'état des gonades comme nous le verrons plus tard.

Les jeunes *Bombina* s'élèvent facilement. Ils sont nourris avec des larves de Chironomes et avec des Drosophiles. Après quelques semaines, les larves de Chironomes seules suffisent.

Pelobates cultripes a l'habitude de s'enfouir dans les terrains meubles. Il s'enfonce dans le sol à reculons en utilisant un éperon métatarsien corné situé à la face interne de chaque pied. L'élevage est réalisé dans un terrarium dont le fond est recouvert d'une couche épaisse de sable humide. Les animaux sont alimentés avec des larves de *Tenebrio*. Le sable, cependant, présente un inconvénient, il arrive, en effet, que les animaux l'avalent avec leurs proies lorsque ces dernières se sont échappées des récipients où elles sont présentées et rampent sur le sable. Le sable s'accumule dans le tube digestif. Au moment de la dissection des animaux morts, nous avons retrouvé des bouchons de sable agglutiné qui obstruaient complètement le rectum.

L'élevage du Pleurodèle après la métamorphose ne présente pas de difficultés (Gallien, 1952). L'animal effectue sa métamorphose dans l'eau et mène ensuite une vie totalement aquatique. Pour les autres espèces d'Urodèles, dès que les larves manifestent les signes de la régression des branchies, elles sont isolées dans les cuvettes inclinées. Pour *Triturus alpestris*, les larves de Chironomes sont déposées dans l'eau, dans la partie basse de la cuvette et les tritons apprennent rapidement à se diriger vers l'eau pour aller chercher la nourriture. Le dispositif est identique avec *Salamandra*, mais la nourriture est offerte à sec dans une coupelle et l'élevage se poursuit, après un mois, dans un terrarium garni de bois mort et de mousse humide.

Triturus helveticus n'a pas présenté les mêmes facilités d'élevage. La métamorphose s'est effectuée normalement mais les animaux ont ensuite refusé toute nourriture. En aucun cas, ils n'ont présenté de réflexe de capture ni le moindre intérêt à l'égard des proies vivantes qui s'agitaient devant eux. Dans l'impossibilité de les gaver individuellement à la pince avec des tronçons de *Tubifex*, nous avons dû abandonner l'élevage et sacrifier les animaux dès l'achèvement de la métamorphose.

Pour le repérage des stades de la vie larvaire, nous avons utilisé les stades de référence fournis par les tables du développement de *Pleurodeles waltlii* (Gallien et Durocher, 1957) et *Triturus helveticus* (Gallien et Bidaud, 1959). Pour *T. alpestris*, les indications fournies par la table du développement de Knight ne vont pas au-delà de l'éclosion ; le développement larvaire ultérieur de cette espèce étant comparable à celui de *Pleurodeles*. nous avons utilisé la numérotation de Gallien et Durocher pour identifier les stades. En l'absence de table de développement pour *Bombina variegata*, *Pelobates cultripes* et *Pelodytes punctatus*, nous avons indiqué la

longueur des larves mesurée depuis les narines jusqu'à la commissure antérieure du cloaque. C'est également cette mensuration qui est prise en considération lorsque la longueur d'une larve appartenant aux autres espèces est citée.

IV. — Traitements hormonaux.

Deux méthodes s'offrent à l'expérimentateur pour administrer le traitement hormonal aux larves d'Amphibiens :

La première consiste à profiter de la vie aquatique stricte que mènent les larves jusqu'au stade de la métamorphose. Des quantités adéquates de la solution alcoolique de l'hormone que l'on désire éprouver sont ajoutées à l'eau d'élevage. Le traitement est administré collectivement, pendant une partie ou la totalité de la vie larvaire libre.

La seconde méthode consiste à injecter à chaque larve une quantité connue de l'hormone en solution huileuse. Plusieurs injections peuvent être effectuées successivement dans le courant de la vie larvaire. Le traitement est alors administré individuellement.

Nous ne savons pas quel équilibre s'établit entre l'eau d'élevage où l'hormone a été dissoute et l'organisme animal qui s'y développe, ni si ce dernier est capable de concentrer l'hormone en lui-même, ni à quelle vitesse, selon quelles étapes, sous quelles formes il est capable de la métaboliser, de la transformer, enfin de l'excréter.

Foote (1941) a effectué des tests qui nous apportent quelques renseignements à cet égard. Des têtards de taille moyenne de *Rana pipiens* étaient placés dans un récipient contenant 500 cm^3 d'eau d'élevage auxquels étaient ajoutés 50 γ d'œstrone. De 12 heures en 12 heures, des prélèvements de cette eau d'élevage furent testés sur des rattes castrées, ainsi que des prélèvements provenant d'un récipient de contrôle ne contenant pas de têtards.

Des tests analogues ont été effectués avec des larves de *Ambystoma opacum*. Il ressort de ces tests que la quantité d'hormone prélevée par les larves à partir de l'eau est très faible. Il n'est pas nécessaire d'ajouter chaque jour de la solution mère de l'hormone. Il suffit de renouveler tous les deux ou trois jours l'eau d'élevage et l'hormone en solution pour que l'on puisse considérer que les animaux séjournent dans un milieu dont la concentration en hormone est constante.

Si l'administration d'hormone à chaque individu permet de connaître avec plus d'exactitude la quantité d'hormone qui a été introduite dans l'organisme au cours d'une expérience, il n'en reste pas moins que nous ne connaissons pas les conditions d'utilisation de la substance administrée. L'étude du métabolisme des hormones stéroïdes chez les larves d'Amphibiens commence à fournir des résultats précis et très intéressants (Ozon, 1963), et l'on peut espé-

rer obtenir, dans un avenir prochain, des réponses précises à ces questions. Il deviendra alors possible d'étudier le métabolisme des hormones stéroïdes administrées au cours des expériences.

L'analyse de l'action masculinisante « paradoxale » du benzoate d'œstradiol chez *Rana temporaria* par Gallien (1941) et chez *R. esculenta* par Padoa (1942) a permis de concilier les résultats opposés que ces deux auteurs avaient obtenus antérieurement. Les faibles concentrations de benzoate d'œstradiol (50-60 γ/l) en solution aqueuse ont la même action féminisante que les doses (20 à 80 γ par animal) administrées par injections de solutions huileuses, cependant que les concentrations élevées (250 à 1.000 γ/l) en solution aqueuse provoquent la masculinisation.

Afin d'obtenir des résultats qui soient comparables dans toute la mesure du possible entre les différentes espèces, nous avons utilisé, pour toutes, la première méthode de traitement. Cependant, chez *Pelobates cultripes*, nous avons dû employer également la méthode des injections de solutions huileuses car elle seule permet l'élevage, dans de grands volumes d'eau renouvelés par l'eau courante, des têtards de grande taille de cette espèce qui supportent mal l'élevage dans des cuvettes, même à la faible densité de un têtard par litre d'eau. Les injections de solutions huileuses d'hormones ont été effectuées au niveau de la région maxillaire inférieure selon la technique utilisée et décrite par Gallien (1944).

L'hormone cristallisée était pesée puis dissoute dans 10 cm^3 d'alcool absolu. Cette solution mère, de concentration connue, était ensuite ajoutée aux quantités connues d'eau d'élevage avec un compte-gouttes calibré. Des solutions mères de différentes concentrations ont été utilisées selon les concentrations finales que nous désirions obtenir.

Sauf exceptions qui sont alors précisées, les traitements ont débuté 1 ou 2 jours après la première prise de nourriture, c'est-à-dire à un moment où l'organisation des gonades n'est pas encore commencée. Ils ont été poursuivis jusqu'au moment où apparaissaient les signes précurseurs de la métamorphose. L'eau d'élevage, aussi bien celle des animaux témoins que celle des animaux traités qui contient l'hormone en solution, a été renouvelée par périodes de 48 heures. Ceci est rendu nécessaire par la pollution rapide de l'eau qui contient l'hormone. Parfois, le traitement hormonal a été interrompu pendant 1 ou 2 jours lorsqu'il s'est révélé fortement toxique pour les larves. Nous avons donc indiqué, lorsqu'il y a lieu, conjointement à la durée de la vie larvaire, la durée totale du traitement correspondant.

Les expériences de contrôle effectuées au cours de recherches antérieures (Gallien, 1944, 1954 b) ont montré que l'alcool ou l'huile utilisés pour préparer les solutions hormonales n'ont pas d'action sur la différenciation des gonades des animaux traités. Aussi, nous n'avons pas renouvelé ces expériences de contrôle pour chacune des espèces éprouvées au cours de notre travail.

Le traitement hormonal a été prolongé au-delà de la métamorphose chez *Pelodytes punctatus* et *Bombina variegata*. Les injections d'huile contenant l'hormone en solution ont été effectuées à la seringue, au niveau du sac lymphatique dorsal après l'anesthésie des animaux à l'éther.

Les expériences ont été réalisées avec les substances suivantes :

— Benzoate d'œstradiol, cristallisé, UCLAF.
— Propionate de testostérone, cristallisé, UCLAF.
— Diéthylstilbœstrol, cristallisé, UCEPHA.
— Diméthylstilbœstrol, cristallisé, (Dr Emmens).
— Diéthylstilbœstrol en solution huileuse (Stilbœstrol Borne).
— Benzoate d'œstradiol en solution huileuse (Benzogynœstryl, Roussel).
— Acétate de testostérone en solution huileuse (Stérandryl, Roussel).

V. — Techniques d'observation.

La plupart des animaux ont été sacrifiés au moment de la métamorphose puis disséqués et observés sous la loupe binoculaire. Ils ont été fixés avec le liquide fixateur de Bouin-Hollande et conservés dans l'alcool à 75°. Les gonades, ou bien les animaux entiers ont été inclus dans la paraffine puis débités en coupes sériées de 7 μ et 7,5 μ d'épaisseur.

Les coupes histologiques ont été colorées au glychémalun-éosine de Mayer ou bien au trichrome de Cajal et à l'Azan selon Heidenhain.

Les squelettes des animaux porteurs de malformations au niveau des membres ont été étudiés et dessinés après leur coloration par le vert de méthyle et l'éclaircissement des tissus environnants dans un mélange de salicylate de méthyle et de benzoate de benzyle.

Technique histochimique de mise en évidence d'une activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde-déshydrogénasique.

Farber, Sternberg et Dunlap (1956) ont exposé une méthode de détection histochimique des enzymes liées au NAD (Nicotinamide-adénine dinucléotide, anciennement DPN) et au NADP (Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate, anciennement TPN) en utilisant un sel de tétrazolium comme accepteur final d'hydrogène.

Wattenberg (1958) a appliqué cette méthode à la recherche de la Δ^5-3β-hydroxystéroïde déshydrogénase. C'est cette même méthode, modifiée ultérieurement par Levy, Deane et Rubin (1959) que nous avons utilisée pour rechercher une activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique chez les larves de *Pleurodeles waltlii*.

Les larves préalablement anesthésiées ont été congelées puis débitées au cryostat en coupes transversales de 10 μ d'épaisseur et collées sur lames. Les lames ont été fixées par un passage durant 1

minute dans le formol dilué à 10 % dans le tampon phosphate (0,1 M) pH 7,1. Cette fixation préliminaire n'altère pas la détection de l'enzyme et elle contribue à une meilleure conservation de la structure des tissus ce qui facilite ultérieurement la localisation de l'enzyme à l'échelle cellulaire.

Les lames ont été mises à incuber pendant 25 minutes à 37° C dans le milieu mis au point par Levy, Deane et Rubin (1959). Le milieu comprenait de la déhydroépiandrostérone (Roussel), du NAD (Sigma) et du Nitro BT ou nitroblue tetrazolium (Dajac). Durant l'incubation, la Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase permet un transfert d'hydrogène de la DHA au NAD qui est transformé en NADH, cependant que la déhydroépiandrostérone est transformée en androsta-4-ène-3, 17 dione. Le NADH qui est formé réduit à son tour le Nitro BT par l'intermédiaire d'une diaphorase avec formation d'un précipité de formazan noir. Pour chaque série de coupes, certaines lames ont été mises à incuber pendant la même durée dans un milieu privé de déhydroépiandrostérone, elles ont servi de témoin. Après l'incubation, les coupes ont été fixées puis colorées par le rouge solide et montées à la gélatine glycérinée.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

PREMIÈRE PARTIE.

TRAITEMENTS PAR LE BENZOATE D'ŒSTRADIOL ET LE PROPIONATE DE TESTOSTÉRONE.

Nous envisagerons successivement l'action du benzoate d'œstradiol puis celle du propionate de testostérone administrés pendant la vie larvaire.

La connaissance des processus et de la chronologie de l'organogenèse des gonades pour chacune des espèces utilisées est une condition nécessaire à la compréhension des résultats des interventions expérimentales. Il est, en effet, important de savoir si les animaux utilisés appartiennent à des races différenciées ou indifférenciées (Hertwig (1912) chez *Rana esculenta* ; Witschi (1923, 1929 c) chez *Rana temporaria* et Swingle (1926) chez *Rana catesbeiana*) et de préciser à quelle étape de l'organogenèse des gonades correspondait le moment où ont débuté les traitements hormonaux.

Nous avons étudié la différenciation sexuelle des gonades de *Triturus helveticus, Salamandra salamandra, Pelodytes punctatus* et *Bombina variegata* cependant que les études correspondantes chez *Pelobates cultripes* et *Triturus alpestris* ont été réalisées au Laboratoire d'Embryologie au titre de Diplômes d'Etudes Supérieures (Tramu, 1958 ; Vandenhende, 1958).

Les travaux de Witschi (1914) sur la différenciation sexuelle des gonades de *Rana temporaria* ont mis en évidence les principales étapes du processus ; leur succession est désormais classique et elle a été retrouvée chez d'autres espèces d'Amphibiens :

Rana sylvatica (Witschi, 1929 a), quatre espèces nord-américaines de Hylidés (Deal, 1931), *Rana agilis* (Vannini, 1938, 1942), *Bombina pachypus* (Vannini, 1947), *Bufo viridis* et *Bufo bufo* (Vannini et Busetto, 1945), *Discoglossus pictus* (Gallien, 1950 d), *Rana esculenta* (Sabbadin, 1951), *Pleurodeles waltlii* (Gallien, 1954 b et Houillon, 1956), *Xenopus laevis* (Gallien, 1956).

Les principales étapes de la différenciation sexuelle sont les suivantes :

— *La formation de la crête génitale* au cours de laquelle les cellules germinales primordiales se disposent de part et d'autre du

mésentère dorsal dans deux replis longitudinaux de l'épithélium péritonéal qui constituent les crêtes génitales ; ces dernières apparaissent nettement pédiculisées sur les coupes histologiques.

— *La formation de la gonade indifférenciée,* constituée de deux territoires : l'un, la *médulla,* est central, il est formé par des cellules des cordons du *rete* ou cordons médullaires qui tirent leur origine du blastème néphrétique sus-jacent, l'autre, le *cortex,* est périphérique, il comprend les cellules germinales et des cellules de l'épithélium péritonéal.

— *La différenciation sexuelle proprement dite* à partir du stade de la gonade indifférenciée. L'évolution subie par la gonade est différente selon que s'organise un ovaire ou un testicule. Dans le premier cas, les cordons du *rete,* dans la médulla, se creusent de lacunes qui confluent et constituent les cavités ovariennes, cependant que les cellules germinales situées dans le cortex se multiplient et se transforment en ovogonies et en ovocytes présentant les stades de la préméiose puis de la vitellogenèse. Dans le second cas, l'évolution se caractérise par l'absence de dégénérescence de la médulla et par la migration des cellules germinales à partir du cortex vers la médulla. Le cortex qui ne contient plus de cellules germinales ne représente plus qu'une enveloppe stérile. Les cellules somatiques de la médulla et les cellules germinales organisent les futurs cystes testiculaires ou les futurs tubes séminifères et à l'intérieur de la gonade les cellules somatiques édifient les canaux du *rete testis* qui communiquent avec les tubes séminifères et se prolongent jusque dans le mésonéphros par les canalicules efférents.

Chez toutes les espèces étudiées, nous avons retrouvé ces étapes. Les seules variations que nous avons notées concernent la chronologie de leur succession. Pour cette raison, nous nous bornerons à préciser pour chaque espèce, au début du paragraphe correspondant, les étapes du processus et leur chronologie en liaison avec des manifestations macroscopiques du développement. L'étude a été effectuée jusqu'à la métamorphose, c'est en effet à ce stade que la plupart des résultats expérimentaux ont été enregistrés. Nous n'avons pas pris en considération la question concernant l'origine des cellules germinales primordiales ou gonocytes qui n'entrait pas dans le cadre de notre travail. Nous rappellerons seulement que les gonocytes sont situés, à un stade proche de l'éclosion, au niveau de la racine du mésentère dorsal. Ils sont alors particulièrement riches en plaquettes vitellines et ils conservent ce caractère pendant une assez longue durée quand les autres cellules de l'embryon sont dépourvues de vitellus. Enfin, il faut rappeler l'existence des corps adipeux qui sont associés aux gonades et sont bien développés chez les animaux adultes. Ils se différencient à la partie antérieure des crêtes génitales chez les Anoures et, chez les Urodèles, sur le côté interne des crêtes génitales sur toute la longueur de celles-ci.

A. — ACTION DE L'HORMONE FEMELLE (BENZOATE D'ŒSTRADIOL).

Les expériences ont été effectuées avec le benzoate d'œstradiol administré en solution hydro-alcoolique. Cependant, chez *Pelobates*, des lots complémentaires ont été traités avec des injections d'une solution huileuse de la même substance.

Selon les résultats obtenus à la métamorphose, les espèces éprouvées peuvent être réparties en 3 groupes de la manière suivante :

— Espèces où l'inversion du sexe est complète. Tous les animaux présentent le même sexe phénotypique. En l'occurrence, tous les individus étaient de sexe femelle. Nous avons obtenu ce résultat chez *Pelobates cultripes* et *Triturus helveticus*.

— Espèces où l'inversion du sexe n'est que partielle. Dans ce cas, deux types de réaction peuvent être reconnus :

ou bien la *sex-ratio* est altérée et l'on trouve une forte proportion d'individus de sexe femelle, cependant que d'autres individus, en faible nombre, sont intersexués ou de sexe mâle, c'est ce que nous avons observé chez *Triturus alpestris*,

ou bien la *sex-ratio* n'est pas à proprement parler altérée, la moitié des animaux sont de sexe femelle cependant que l'autre moitié portent des gonades intersexuées d'un type aberrant mais qui sont assez comparables d'un individu à l'autre quant à leur aspect et leur structure, ces derniers animaux correspondent aux mâles génétiques. Ce type de réaction est présenté par *Salamandra salamandra* et *Pelodytes punctatus*.

— Espèces où aucune inversion du sexe n'est obtenue. La *sex-ratio* n'est pas altérée et les animaux portent des gonades femelles et mâles dont l'aspect et la structure sont comparables à ceux des gonades des animaux témoins. *Bombina variegata* appartient à ce dernier groupe.

I. — *Pelobates cultripes*.

Différenciation sexuelle.

larves de 4,5 mm à 6 mm :	Formation des crêtes génitales paires pédiculisées.
larves de 11,5 mm :	Crêtes génitales paires pédiculisées.
larves de 16 mm à 26 mm :	Constitution de la gonade indifférenciée. Augmentation sensible du nombre des gonocytes, de 40 en moyenne aux stades précédents à plus de 300. Aspect moniliforme des gonades.
larves de 35 mm :	Début des différenciations sexuelles mâle et femelle.
métamorphose :	La différenciation des testicules et des ovaires est achevée (fig. 30 et 31, Pl. IV ; fig. 84 et 85, Pl. IX).

Chez *Pelobates cultripes*, la différenciation sexuelle mâle s'effectue directement sans que les gonades passent par un stade de différenciation ovarienne. En aucun cas, nous n'avons observé les signes d'une intersexualité, même transitoire, au cours de la différenciation des gonades. Ces faits ainsi que l'existence d'une *sex-ratio* de type 1 ♀ : 1 ♂ chez les animaux témoins au moment de la métamorphose nous permettent de conclure que les Pélobates que nous avons utilisés dans nos expériences appartenaient à une race différenciée.

Les renseignements et les résultats concernant les expériences effectuées avec le benzoate d'œstradiol sur *Pelobates cultripes* sont rassemblés dans les Tableaux I et II.

Série expérimentale I.

Deux expériences ont été réalisées en 1957 avec les larves issues d'une ponte récoltée au début de Mars 1957. Dans la première (lots $A_{57}T$, $A_{57}DK_1$, $A_{57}DK_3$), l'hormone a été administrée en solution hydro-alcoolique. Au moment de la mise en route de l'expérience, les animaux étaient âgés d'une quinzaine de jours, ils mesuraient en moyenne 5 mm de long. Les bourgeons des membres postérieurs n'étaient pas visibles.

Une mortalité très élevée est survenue dans les trois lots. Il ne semble pas que l'administration de l'hormone en solution hydro-alcoolique soit responsable de la mortalité qui s'est révélée aussi importante dans le lot témoin que dans les lots traités. Il apparaît qu'elle a plutôt été provoquée par les conditions de l'élevage qui est rendu particulièrement difficile dans les faibles volumes d'eau étant donnée la grande taille des têtards. Le nombre des animaux survivants ne permettant pas d'attendre de cette expérience des résultats significatifs, nous avons entrepris une seconde expérience (lots $C_{57}T$, $B_{57}DK$) au cours de laquelle l'hormone a été administrée en solution huileuse et les têtards ont été élevés dans de grands volumes d'eau constamment renouvelée.

Les animaux ont reçu deux injections successives d'une solution huileuse de benzoate d'œstradiol (Benzogynœstryl-5 de Roussel). Au cours de la première injection, le 6.VI.57, 68 têtards ont reçu chacun 60 γ de benzoate d'œstradiol, et 67 têtards survivants ont reçu chacun, le 27.VI.57, au cours de la seconde injection, 145 γ de la même substance.

Cependant des pertes peuvent survenir au cours de l'opération, il arrive notamment que des gouttelettes de la solution huileuse s'échappent dans la cavité branchiale par l'orifice de pénétration de la pipette. Nous avons évalué approximativement les pertes au quart des quantités injectées, si bien que les têtards ont reçu au total environ 150 γ de benzoate d'œstradiol.

Au moment de la première injection, les animaux mesuraient 22 mm de long et présentaient des bourgeons des membres postérieurs de forme conique allongée. Quelques animaux de même âge et dans

TABLEAU I. — Protocole expérimental des traitements de *Pelobates cultripes* avec le benzoate d'œstradiol.

Lot expérimental	Elevages en cuvettes (hormone en solution aqueuse)			Elevages dans de grands aquariums (hormone en solution huileuse)				
	Pba $A_{57}T$	Pba $A_{57}DK_1$	Pba $A_{57}DK_3$	Pba $C_{57}T$	Pba $B_{57}DK$	Pba $A_{61}DK$	Pba $A_{60}T$	Pba $A_{61}T$
Début du traitement (âge, taille)	15 j 5 mm	15 j 5 mm	15 j 5 mm	98 j 22 mm	98 j 22 mm	435 j 27 mm		
Traitement hormonal. Concentrations.	lot témoin	500 γ/l	50 γ/l	lot témoin	2 injections 150 γ/animal	2 injections 140 γ/animal	lot témoin	lot témoin
Nombre d'animaux traités	50	50	50	60	68	60	Stock de têtards élevés dans un bac à l'extérieur du laboratoire	
Mortalité pendant l'élevage	36	44	35	0	1	7		
Durée de la vie larvaire	121 j à 165 j	125 j à 158 j	121 j à 162 j	122 j à 166 j	122 j à 165 j	484 j à 526 j	196 j à 222 j	479 j à 518 j
Animaux mis en élevage après métamorphose (1)	0	0	0	40	30	26	0	0

(1) Les animaux mis en élevage sont étudiés dans la quatrième partie.

le même état de développement ont été disséqués et fixés. A ce moment, sous les corps adipeux qui sont en début d'organisation, les crêtes génitales apparaissent comme de très fins filaments de 4 à 5 mm de longueur au niveau desquels il n'est pas encore possible de distinguer les épaississements correspondant aux gonomères.

TABLEAU II. — Résultats des traitements de *Pelobates cultripes* avec le benzoate d'œstradiol.

Lot expérimental		Elevages en cuvettes (hormone en solution aqueuse)			Elevages dans de grands aquariums (hormone en solution huileuse)				
		Pba $A_{57}T$	Pba $A_{57}DK_1$	Pba $A_{57}DK_3$	Pba $C_{57}T$	Pba $B_{57}DK$	Pba $A_{61}DK$	Pba $A_{60}T$	Pba $A_{61}T$
Animaux étudiés à la métamorphose		14	6	15	20	37	27	12	21
Répartition des sexes	♂	7	0	0	9	0	0	5	13
	♀	0	0	0	0	0	0	0	0
	♀	7	5	12	11	37	27	7	8
Sexe non identifiable		0	1	3	0	0	0	0	0

Résultats : 20 animaux témoins du lot $C_{57}T$ ont été disséqués et fixés à la métamorphose. Ils se répartissaient ainsi : 9 mâles et 11 femelles. A ce stade, le sexe des gonades se reconnaît aisément (fig. 30 et 31, Pl. IV). Les testicules ont la forme de navettes allongées, ils mesurent en moyenne 2,5 mm de longueur et 0,5 mm de largeur. Leur coloration est blanche, ils sont parfois recouverts de quelques cellules pigmentaires. Les ovaires sont blancs, godronnés et leur longueur est comprise entre 3,5 et 4 mm.

Parmi les animaux du lot $B_{57}DK$, 30 ont été mis en élevage et 37 ont été disséqués et fixés à la métamorphose. Ils étaient tous de sexe femelle et portaient des ovaires caractéristiques (fig. 32, Pl. IV). La structure histologique des ovaires des animaux féminisés est la même que celle des ovaires des animaux témoins. Le cortex ovarien contient de nombreuses ovogonies dont quelques unes, situées à la face interne du cortex le long de la paroi du sac ovarien, sont à l'état d'auxocytes (fig. 84, Pl. IX). Ces auxocytes mesurent en moyenne de 35 à 50 μ de diamètre et leur noyau dilaté, à l'intérieur duquel se devine le réseau des chromosomes en écouvillon, a un diamètre compris entre 18 et 30 μ. Les oviductes sont sensiblement plus développés chez les animaux traités que chez les témoins. Leur dilatation est particulièrement nette au niveau de la partie antérieure. L'étude des coupes histologiques confirme l'observation macroscopique. Chez

une femelle témoin, à la hauteur de l'extrémité antérieure du mésonéphros, les deux oviductes dans lesquels on ne distingue aucune lumière ont un diamètre de 18 μ environ et ils sont contenus, de part et d'autre du mésonéphros, dans les lobes müllériens dont la hauteur est de 50 μ et la largeur de 42 μ. Chez une femelle du lot $B_{57}DK$, au niveau correspondant, les lobes müllériens sont hauts de 80 μ environ et larges de 55 μ, cependant que les oviductes ont un diamètre de 35 μ et sont creusés d'une lumière large de 10 μ.

Série expérimentale II.

Une ponte récoltée en Mars 1960 nous a permis de renouveler cette dernière expérience, d'une part en 1960, dans le but de comparer les effets des injections du benzoate d'œstradiol et du diéthylstilbœstrol (voir la deuxième partie) et d'autre part en 1961. La ponte avait été récoltée au début du mois de Mars 1960. Les larves avaient atteint le stade du bourgeon caudal le 8 Mars, elles se sont alimentées pour la première fois le 15 Mars et à partir de cette date elles ont été élevées à l'eau courante dans un grand aquarium en ciment situé à l'air libre, hors du laboratoire. Dans ces conditions, la chronologie du développement s'est révélée très variable selon les individus.

Un certain nombre de larves ont été utilisées en Juin 1960 au cours d'expériences comparatives (voir la deuxième partie), parmi les animaux restants 12 se sont métamorphosés en 1960 (lot $A_{60}T$) chez lesquels la répartition des sexes était la suivante : 5 mâles et 7 femelles. Tous les autres animaux ont passé l'hiver 1960-1961 à l'état de têtards. La taille de ces têtards était très variable, cependant, chez aucun d'entre eux les membres postérieurs ne dépassaient l'état de bourgeons coniques. Ces animaux ont fourni le matériel du lot $A_{61}DK$. Deux injections de benzoate d'œstradiol en solution huileuse ont été réalisées ; au cours de la première, le 9.V.1961, 60 têtards de taille identique ont reçu chacun 60 γ, au cours de la seconde, le 9.VI.1961, 59 têtards survivants ont reçu chacun 125 γ. La quantité totale reçue par chaque animal au cours de l'expérience est de l'ordre de 140 γ.

Les animaux ont été élevés dans l'eau courante. Ils se sont métamorphosés dans le courant de l'été de 1961.

Le jour de la première injection, 4 animaux de la taille de ceux qui ont été injectés, ont été disséqués et fixés. Ils mesuraient 27 mm de long. Les gonades étaient filiformes, 2 ou 3 gonomères seulement étaient visibles dans leur partie antérieure. Malgré le développement très lent des têtards, échelonné sur deux années, l'état des gonades des larves sacrifiées le 9.V.1961 indique que la chronologie de la différenciation sexuelle a suivi la chronologie du développement des autres parties de l'organisme, jusqu'à ce moment de la vie larvaire. Rappelons que c'est lorsque la larve mesure 35 mm de long que débute la différenciation sexuelle des gonades.

Résultats : Parmi les animaux témoins (lot Pba $A_{61}T$) qui se sont métamorphosés dans le courant de l'été de 1961, 21 ont été disséqués et fixés au moment de la métamorphose. La répartition des sexes était la suivante : 13 mâles et 8 femelles. Parmi les animaux injectés (lot Pba $A_{61}DK$) :

7 animaux sont morts en cours d'élevage ;

27 ont été sacrifiés au moment de la métamorphose, ils ont été disséqués et fixés : ils étaient tous de sexe femelle et leurs oviductes s'étaient dilatés sous l'action du benzoate d'œstradiol ;

26 ont été élevés après la métamorphose, l'étude de leur évolution est exposée dans la quatrième partie.

L'examen des résultats présentés dans le Tableau II permet de conclure que dans les meilleures conditions expérimentales, c'est-à-dire dans le cas de l'injection de solutions huileuses, le benzoate d'œstradiol administré à des têtards de *Pelobates cultripes* avant le début de la différenciation sexuelle féminise les gonades des mâles génétiques. A la métamorphose, ces gonades ne se distinguent en rien des ovaires des femelles témoins. D'autre part, l'injection de benzoate d'œstradiol provoque une hypertrophie des oviductes.

Les résultats obtenus dans les lots Pba $A_{57}DK_1$ et Pba $A_{57}DK_3$ sont superposables à ceux obtenus dans les lots Pba $B_{57}DK$ et Pba $A_{61}DK$ que nous venons d'analyser. Chez *Pelobates cultripes*, l'action du benzoate d'œstradiol sur les gonades et les oviductes est la même quel que soit le mode d'administration choisi.

Action tératogène du benzoate d'œstradiol administré en solution hydro-alcoolique.

Il est important de noter, en outre, que la plupart des animaux de deux lots, Pba $A_{57}DK_1$ et Pba $A_{57}DK_3$, présentaient à la métamorphose des anomalies au niveau des membres. Celles-ci étaient caractérisées :

1) par une *clinodactylie* au niveau du membre antérieur. Les mains portent, comme normalement, 4 doigts, mais le dernier doigt externe ou bien les deux derniers doigts externes sont coudés vers le côté interne (fig. 3, Pl. I). 4 animaux du lot Pba $A_{57}DK_1$ et 10 animaux du lot Pba $A_{57}DK_3$ présentaient cette malformation.

2) par une *ectrodactylie* antérieure. Chaque main porte 3 doigts au lieu de 4 (fig. 2, Pl. I). Deux animaux du lot Pba $A_{57}DK_1$ présentaient cette anomalie sur chaque main, un animal du lot Pba $A_{57}DK_3$ la présentait au niveau de la main droite, et dans ce cas particulier, le doigt le plus externe était coudé vers le côté interne, cependant qu'au niveau de la main gauche du même animal s'observait la clinodactylie décrite précédemment.

3) par une *ectrodactylie* postérieure, caractérisée par l'absence de quelques orteils ou de la totalité des orteils.

Un animal du lot Pba $A_{57}DK_1$, par ailleurs clinodactyle au niveau des mains portait, au lieu de 5 orteils et de l'éperon métatarsien kératinisé caractéristique du genre *Pelobates* (fig. 4, Pl. I), au niveau du pied gauche 4 orteils et l'éperon métatarsien et au niveau du pied droit seulement 3 orteils, l'éperon métatarsien était absent.

Chez deux animaux du lot Pba $A_{57}DK_3$, la disparition des orteils était presque complète. Les membres postérieurs n'étaient plus représentés que par des moignons effilés ou bien par un moignon tronqué au niveau de la jambe, c'est le cas de l'animal dont les membres postérieurs sont représentés sur la figure 5, planche I. Un autre animal du même lot présentait un membre postérieur gauche normal et un membre postérieur droit tronqué au niveau de l'articulation tibio-tarsienne.

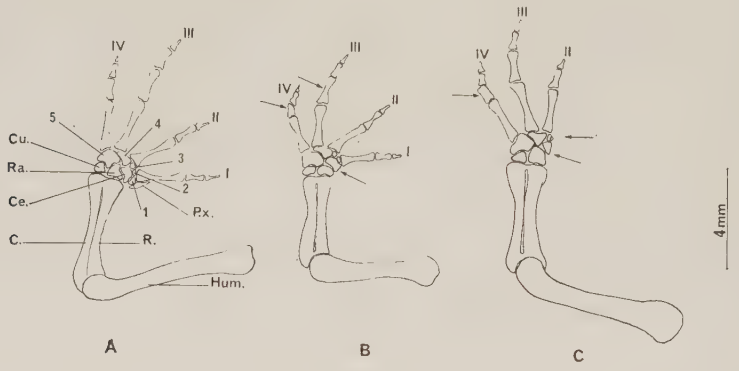

Figure 1.

Squelettes de membres antérieurs gauches, vus par la face dorsale, de *Pelobates cultripes* (dessins à la chambre claire).

A. Animal témoin.

B. Animal clinodactyle du lot Pba A_{57} DK_1 traité par l'hormone femelle. Remarquer la disparition de l'os prépollex et du premier os carpien ainsi que les déformations des premières phalanges des troisième et quatrième doigts.

C. Animal ectrodactyle du lot Pba A_{57} DK_1 traité par l'hormone femelle. Observer la disparition de l'os prépollex, du premier os du carpe et du premier doigt, ainsi que la réduction de l'os central et la déformation de la première phalange du quatrième doigt.

I, II, III, IV : premier, second, troisième et quatrième doigts. 1, 2, 3, 4, 5 : premier, second, troisième, quatrième et cinquième os carpiens. C. : cubitus, Ce. : central, Cu. : cubital, Hum. : humérus, P.x. : prépollex, R. : radius, Ra. : radial.

L'étude du squelette des membres après sa coloration par le vert de méthyle et l'éclaircissement des tissus environnants nous a permis de constater que la clinodactylie est provoquée au niveau du troisième doigt par une légère coudure de la première phalange en son milieu et au niveau du quatrième doigt par une déformation de la première articulation interphalangienne, la première phalange est très courte et sa surface articulaire distale est oblique vers le

côté interne de telle sorte que la seconde phalange qui s'articule avec elle est dirigée vers le côté interne. Ces transformations sont visibles au niveau du squelette de la main représenté sur la figure 1 B où l'on peut observer également la disparition de l'os prépollex et du premier os du carpe qui s'articule normalement sur l'os central (figure 1 A).

L'ectrodactylie antérieure représentée sur la figure 1 C, est provoquée par la disparition du premier doigt interne : d'une part, l'os prépollex et le premier os du carpe sont absents, l'os central est de petite taille ainsi que les os du carpe 2 et 3, d'autre part les deux doigts externes qui portent trois phalanges sont présents, enfin le doigt le plus externe porte une première phalange raccourcie et déformée analogue à celle que nous avons observée sur le doigt le plus externe chez les animaux clinodactyles. L'ectrodactylie apparaît ainsi comme une aggravation de l'agénésie de la région interne du squelette de la main que nous avons observée chez les animaux clinodactyles.

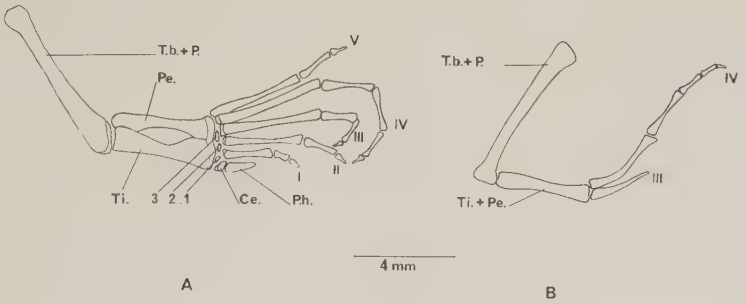

FIGURE 2.

Squelettes des extrémités distales de membres postérieurs droits, vus par la face dorsale, de *Pelobates cultripes* (dessins à la chambre claire).

A. Animal témoin.

B. Animal ectrodactyle du lot Pba A_{57} DK_3 traité par l'hormone femelle. Noter la fusion des os tibial et péronéal, la disparition des os du tarse, la disparition du préhallux et des orteils I, II et V ainsi que la réduction de l'orteil III.

I, II, III, IV, V : premier, second, troisième, quatrième et cinquième orteils. 1, 2, 3 : premier, second et troisième os tarsiens. Ce. : central, P. : péroné, Pe. : péronéal, P.h. : préhallux, T.b. : tibia, Ti. : tibial.

Dans les cas d'ectrodactylie au niveau du membre postérieur, le premier segment tarsien normalement très long et constitué de deux os, le péronéal et le tibial (fig. 2 A), n'est plus représenté que par un seul os et le membre s'arrête net à ce niveau ou bien il est prolongé, sans os tarsiens intermédiaires, par deux orteils, dont l'un est composé d'un métatarsien à l'extrémité effilée et l'autre d'un métatarsien et de quatre phalanges ce qui permet de l'identifier comme l'orteil n° 4 (comparer les figures 2 A et 2 B représentant les squelettes des parties distales du membre postérieur droit d'un animal témoin et de l'animal $A_{57}DK_3$ représenté figure 5, planche I).

Il nous a paru intéressant de prendre en considération ces anomalies du développement du squelette. En effet, elles ne sont apparues que chez les animaux des lots traités et seulement dans les lots où l'hormone a été administrée en solution hydro-alcoolique. Presque tous les animaux traités par le benzoate d'œstradiol, 16 sur 21, ont présenté des anomalies au niveau des membres antérieurs. Nous n'avons pas rencontré ces anomalies chez les témoins, ni chez les animaux traités par le propionate de testostérone, élevés dans les mêmes conditions. D'autre part, les anomalies au niveau des membres postérieurs, peu nombreuses, sont apparues chez les animaux traités avec le benzoate d'œstradiol et avec le propionate de testostérone (lot Pba $A_{57}EK_1$, 2 cas d'ectrodactylie postérieure, voir page 59). Elles ne sont pas apparues chez les témoins.

L'alcool utilisé comme solvant pour la préparation des solutions-mères n'est pas responsable de cette action. En effet, aucune anomalie du membre antérieur n'est apparue dans les lots traités avec l'hormone mâle et aucune anomalie du membre postérieur n'est apparue dans le lot Pba $A_{57}EK_3$ traité avec cette hormone, alors que les quantités d'alcool administrées à la faveur du traitement hormonal étaient identiques.

Les anomalies n'ont pas été observées chez les animaux traités par des injections de solutions huileuses. Faut-il envisager que le mode d'administration des hormones a été déterminant dans l'apparition des anomalies dans la mesure où il a conditionné la quantité réelle de l'hormone administrée qui a pénétré dans l'organisme et qui a pu agir au niveau des blastèmes des membres au cours de leur différenciation ? C'est ainsi qu'il a été possible de rendre compte de l'effet paradoxal produit par le benzoate d'œstradiol sur la différenciation de la gonade des Ranidés. Il faut noter, pourtant, que les anomalies observées sont apparues aux concentrations très différentes de 500 γ/litre (lot Pba $A_{57}DK_1$) et de 50 γ/litre (lot Pba $A_{57}DK_3$) de benzoate d'œstradiol.

Nous pensons qu'il convient de considérer plus particulièrement ici le stade du développement atteint par les larves au moment où les traitements hormonaux ont débuté :

lot A_{57}, les têtards étaient âgés de 16 jours environ, les bourgeons des membres postérieurs n'étaient pas visibles ; *lot* B_{57}, les têtards étaient âgés de 96 jours environ et les membres postérieurs étaient visibles à l'état de bourgeons de forme conique. Il nous paraît plausible de conclure que les hormones ont manifesté une action tératogène sur les membres en cours de différenciation dans la mesure où leur administration a été suffisamment précoce.

L'action tératogène du benzoate d'œstradiol sur l'organogenèse des membres a été étudiée chez *Bufo vulgaris formosus* et *Rana* sp. par Takahashi (1957, 1958 b). L'auteur en utilisant de très fortes concentrations de cette substance ajoutées à l'eau d'élevage a obtenu des anomalies du développement des têtards.

Les têtards de *Bufo vulgaris formosus* élevés dans une solution aqueuse d'œstradiol à la concentration de 2000 γ/litre présentaient : un retard de la croissance générale, un aspect œdémateux et des anomalies du développement des membres antérieurs et postérieurs. Les os des parties distales des membres étaient incomplètement formés, le segment tibiofibulaire était sensiblement raccourci ; les os du pied étaient fusionnés et les os de la région palmaire n'étaient plus représentés que par des petites masses osseuses de forme irrégulière.

Les têtards de *Rana* sp. élevés dans une solution aqueuse d'œstradiol à la concentration de 1500 γ/litre (la concentration de 2000 γ/litre est narcotique) ont également présenté des anomalies des membres antérieurs et postérieurs et Takahashi (1958 b) a démontré que ces anomalies ne sont obtenues que si le traitement débute 8 jours après l'éclosion, au moment de la disparition des branchies externes. Lorsque le même traitement débute 13 jours ou 20 jours après l'éclosion, le développement des membres est normal. Ces résultats et ceux que nous avons obtenus chez *Pelobates cultripes* s'accordent avec les résultats qui ont été obtenus chez d'autres espèces animales par l'administration de nombreuses substances tératogènes (Angel, 1950). Ils montrent qu'il existe, au cours du développement des ébauches, une période critique pendant laquelle peut s'exercer l'action tératogène de certaines substances.

Nous signalerons enfin que Tschumi (1954, 1964) a obtenu chez *Xenopus* des régressions des doigts et quelques anomalies dans le développement de la patte à la suite d'un traitement précoce avec la méthyl-bis-chloréthylamine. A cette occasion, l'auteur a observé que la régression de certains rayons de la patte de *Xenopus* s'effectue dans un ordre déterminé.

II. — *Triturus helveticus.*

Différenciation sexuelle :

Stade 38 (larves âgées de 13 jours) : disposition impaire des gonocytes au-dessus du mésentère dorsal.

Stade 39 (14 jours) : disposition paire des gonocytes.

Stade 42 (18 jours) : pédiculisation des crêtes génitales dans leur partie antérieure.

Stade 46 (27 jours) : pédiculisation des crêtes génitales achevée.

Stade 47 (29 jours) au stade 51 (36 jours) : apparition des cordons du *rete* et multiplication des cellules germinales primordiales.

Stade 52 (39 jours) : début de la différenciation sexuelle.

Stades 53 (43 jours) et 54 (47 jours) : la différenciation sexuelle mâle s'achève ; le cortex des ovaires s'épaissit et renferme des nids d'ovogonies.

Stades 55 c (81 jours) : présence d'ovocytes en préméiose dans le cortex ovarien.

La différenciation des testicules qui s'effectue directement, sans trace d'intersexualité, à partir de la gonade indifférenciée ainsi que la *sex-ratio* observée à la métamorphose chez les animaux témoins (Tableau III) nous permettent de conclure que les animaux utilisés appartenaient à une race différenciée.

TABLEAU III. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Triturus helveticus* traitées par le benzoate d'œstradiol.

Lot expérimental		TH $D_{57}T$	TH $D_{57}DK_1$	TH $D_{57}DK_3$
Nombre d'animaux mis en traitement		60	50	50
Traitement. Concentration hormonale		lot témoin	Benzoate d'œstradiol 500 γ/l	Benzoate d'œstradiol 50 γ/l
Age et stade atteints au début du traitement		20 jours, st. 42	20 jours, st. 42	20 jours, st. 42
Durée du traitement		49 jours à 89 jours	79 jours à 98 jours	88 jours à 95 jours
Mortalité pendant l'élevage		25	12	16
Nombre d'animaux fixés au moment de la métamorphose		35	38	34
Répartition des des sexes	♂	17	0	0
	♀	0	0	0
	♀	18	38	31
Sexe non identifiable		0	0	3

Trois lots ont été mis en expériences le 7.III.1957. Les larves âgées de 20 jours en moyenne avaient atteint le stade de la prise de nourriture (stade 42 de la table de Gallien et Bidaud). A ce stade du développement les crêtes génitales sont pédiculisées seulement dans leur partie antérieure. Les résultats sont rassemblés dans le tableau III. Dans les trois lots, la mortalité a été assez élevée, notamment au cours des premières semaines de l'élevage et la durée de la vie larvaire a été sensiblement la même bien que quelques animaux du lot TH $D_{57}T$ se soient métamorphosés très précocement (à 70 jours au lieu de 90 jours en moyenne). Des animaux des lots TH DK_1 et TH DK_3 traités par le benzoate d'œstradiol ont été fixés avant que la régression des branchies ne soit totalement achevée. A l'approche de la métamorphose, ces animaux présentaient des signes manifestes d'ascite et un très fort œdème visible au niveau de la gorge, de la

queue et des membres qui apparaissaient considérablement gonflés. Les résultats obtenus dans le lot TH $D_{37}T$ indiquent clairement que chez *T. helveticus* la répartition des sexes à la métamorphose se fait selon le mode 1 ♂ : 1 ♀. A ce moment, le sexe des gonades est reconnaissable macroscopiquement. Les ovaires ont l'aspect de bandelettes blanches dont les extrémités sont arrondies. Ils débordent latéralement les corps adipeux sous lesquels ils sont fixés, le long du mésentère dorsal. Leur longueur est comprise entre 1,5 mm et 2 mm. Leur largeur, mesurée sur des coupes histologiques est comprise entre 250 et 350 µ. Les testicules sont généralement moins allongés que les ovaires (leur longueur est comprise entre 1 mm et 1,2 mm). Leur forme est différente de celle des ovaires, ils sont plus effilés à leurs extrémités. Une partie plus élargie située entre la moitié et le tiers postérieur de leur longueur leur donne un aspect piriforme ou de navette.

L'observation histologique des gonades des animaux témoins permet de reconnaître au niveau des ovaires une cavité ovarienne assez large. Elle sera comblée ultérieurement par les auxocytes en cours de croissance. Le cortex contient principalement des ovogonies dont les noyaux sont aux différents stades de la préméiose. Elles sont groupées en nids. Les auxocytes sont peu nombreux, ils mesurent en moyenne 55 µ de diamètre, leur noyau est volumineux et mesure en moyenne 35 µ de diamètre. L'épaisseur totale de la bandelette ovarienne est comprise entre 100 et 150 µ.

Les testicules ont une structure homogène. Les cellules germinales se répartissent isolément parmi les cellules somatiques et l'ensemble est recouvert par une albuginée très mince qui représente les vestiges du cortex de la gonade indifférenciée. A la métamorphose, la plupart des testicules ne contiennent que des spermatogonies primaires, ce sont des cellules de grande taille, de 35 µ de diamètre en moyenne, leur noyau lobé est volumineux (25 µ de diamètre), il est faiblement coloré par le glychémalun et contient 2 ou 3 nucléoles. La largeur des testicules dans leur partie moyenne, qui est la plus développée, varie de 80 à 120 µ et leur épaisseur de 50 à 65 µ. Cependant, quelques testicules plus volumineux (180 µ de largeur moyenne et 100 µ d'épaisseur) contiennent, en même temps que des spermatogonies primaires, des spermatogonies dont le diamètre moyen est de 20 µ et dont la chromatine du noyau apparaît sous la forme de granulations colorées en violet par le glychémalun-éosine. Ces spermatogonies sont isolées ou bien groupées par 2 ou par 3 et elles sont entourées de cellules somatiques dont les noyaux allongés apparaissent appliqués à leur périphérie. Ces nids de spermatogonies entourées de cellules folliculaires correspondent à l'amorce des futurs cystes du testicule de l'animal adulte (fig. 70, Pl. VIII).

Les résultats obtenus dans les lots TH $D_{37}DK_1$ et TH $D_{37}DK_3$ sont particulièrement nets. 38 animaux fixés du lot TH DK_1 étaient tous femelles. Dans le lot TH DK_3, sur 34 animaux fixés, 3 portaient des gonades non identifiables et 31 autres portaient des ovaires.

L'absence d'individus de sexe mâle d'une part et le nombre d'individus de sexe femelle obtenus dans chaque lot par rapport au nombre d'animaux mis en expérience d'autre part, indiquent que l'administration de benzoate d'œstradiol a eu pour résultat la féminisation des gonades des individus génétiquement mâles. Il n'y a pas de différence entre les résultats obtenus dans les deux lots bien que les concentrations utilisées aient été différentes (500 γ/l et 50 γ/l). Chez les témoins à la métamorphose, les oviductes ne sont pas différenciés sur la totalité de leur longueur mais nous avons pu constater que chez les animaux traités par le benzoate d'œstradiol la différenciation des oviductes ne s'était pas effectuée. Seuls les ostiums étaient présents et s'étaient dilatés sous l'action de l'hormone œstrogène.

L'étude histologique a confirmé les résultats observés macroscopiquement. Les ovaires présentent des cavités ovariennes caractéristiques. Le cortex contient des nids d'ovogonies en préméiose et de nombreux auxocytes de la même taille que ceux observés dans les ovaires des femelles témoins. Il arrive chez certains individus que les auxocytes comblent entièrement la cavité ovarienne centrale. Chacun est entouré de cellules folliculaires dont les noyaux sont visibles appliqués à la surface du cytoplasme (fig. 71, Pl. VIII).

Macroscopiquement, les lésions au niveau des reins se présentent sous l'aspect de boursouflures irrégulières provoquées par la dilatation importante des chambres glomérulaires dont la paroi distendue, transparente, laisse voir le glomérule. Les coupes histologiques nous ont permis d'observer ces lésions, les chambres glomérulaires et les tubules rénaux sont dilatés. Leurs lumières contiennent des granulations éosinophiles parfois tellement denses qu'elles semblent remplies d'une masse éosinophile homogène. Le cytoplasme des parois des tubules rénaux contient également de nombreuses granulations éosinophiles. En outre, à l'intérieur des vaisseaux sanguins les globules rouges apparaissent noyés dans un amas de très fines granulations éosinophiles. Ces lésions que nous avons retrouvées chez *Triturus alpestris* apportent une explication à l'œdème et à la mortalité observés à la fin de la vie larvaire chez les animaux traités par le benzoate d'œstradiol. Ce dernier perturbe vraisemblablement le fonctionnement rénal. Les animaux sont intoxiqués par les déchets qu'ils ne peuvent plus éliminer et qui s'accumulent dans le sang et dans le tissu conjonctif interstitiel où de très fines granulations éosinophiles sont visibles entre les lames du tissu conjonctif distendues par l'œdème. Les figures 59 et 60, planche VII, donnent des images de ces lésions chez *T. alpestris*. elles sont identiques à celles observées chez *T. helveticus*.

En résumé, chez *Triturus helveticus*, l'administration de benzoate d'œstradiol en solution hydro-alcoolique pendant la vie larvaire se traduit, tout d'abord par la féminisation complète des gonades des mâles génétiques (à la métamorphose tous les animaux portent des ovaires), ensuite par l'inhibition de la différenciation des oviductes,

à l'exception des ostiums qui sont stimulés par l'hormone administrée, enfin par un effet pathogène au niveau des reins qui entraîne l'intoxication et la mort des animaux à l'approche de la métamorphose.

III. — *Triturus alpestris.*

Différenciation sexuelle.

Stade 38 (longueur totale : 8,5 mm) : disposition paire des gonocytes les plus antérieurs.
Stade 42 : début de la pédiculisation des crêtes génitales.
Stade 45 (longueur totale : 14 mm) : la pédiculisation des crêtes génitales est achevée.
Stade 50 : les gonades indifférenciées sont constituées.
Stade 51 (longueur totale : 15 mm) : le nombre moyen des gonocytes passe de 40 aux stades précédents à 130, bourgeon du corps adipeux à la face interne de chaque mésogonium.
Stade 52 (longueur totale : 2 cm) : gonades toujours indifférenciées, ébauches des corps adipeux pédiculisées.
Stade 53 (longueur totale : 2,4 cm) : début de la différenciation sexuelle, apparition sur le bord externe des canaux de Wolff des cellules des lobes müllériens.
Stades 54 et 55 b : achèvement de la différenciation sexuelle mâle, individualisation des nids d'ovogonies, apparition d'ovocytes en préméiose.
Stade 55 c (métamorphose, longueur totale : 3 cm) : nombreux auxocytes dans le cortex ovarien, les canaux de Müller sont formés.

La différenciation sexuelle mâle directe des gonades et la répartition des sexes chez les animaux témoins à la métamorphose (Tableau IV) nous permettent de conclure que les animaux étudiés appartenaient à une race différenciée.

Trois lots ont été mis en expérience à des dates différentes. Toutes les larves utilisées étaient issues de pontes récoltées dans le même aquarium. Les données numériques concernant ces expériences sont rassemblées dans le Tableau IV. La durée moyenne de l'expérience a été de 90 jours, celle de la vie larvaire, de 110 jours. Cependant, la métamorphose des animaux traités par le benzoate d'œstradiol s'est étendue sur une longue période et quelques uns se sont métamorphosés à l'âge de 140 jours. La mortalité, très faible au début de l'expérience, est devenue plus importante à l'approche de la métamorphose et elle a frappé également les animaux en cours de métamorphose.

Le sexe des gonades des animaux témoins est reconnaissable macroscopiquement. Les ovaires apparaissent comme des bandelettes blanches, larges, à la surface desquelles sont visibles des boursouflures dues à la présence des auxocytes. Les testicules sont plus

étroits, ils sont moins larges que les corps adipeux qui les recouvrent, alors que les ovaires débordent latéralement les corps adipeux (fig. 15 et 18, Pl. II). Tous les animaux du lot témoin TA $D_{57}T$ étaient différenciés à la métamorphose et comprenaient sensiblement autant de mâles que de femelles.

Les résultats obtenus dans les lots TA $A_{57}DK_1$ et TA $C_{57}DK_3$, traités par benzoate d'œstradiol, sont tout à fait comparables entre eux malgré la différence entre les concentrations utilisées (500 γ/l et 50 γ/l). Il y avait, à la métamorphose, un excédent d'individus de sexe femelle. La plupart étaient identifiables macroscopiquement, les ovaires ayant le même aspect caractéristique que chez les femelles témoins. D'autres animaux portaient des gonades plus étroites d'aspect testiculaire ou vestigial dont l'identification était douteuse. L'étude histologique de ces gonades nous a montré qu'il s'agissait ou bien de gonades femelles qui n'avaient pas été reconnues lors du premier tri, ou bien de gonades intersexuées, enfin de gonades mâles. Dans les deux lots groupés, sur 54 animaux fixés à la métamorphose, nous avons obtenu : 40 femelles, 4 intersexués, 10 mâles.

TABLEAU IV. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Triturus alpestris* traitées par le benzoate d'œstradiol.

Lot expérimental		TA D_{57} T	TA A_{57} DK_1	TA C_{57} DK_3
Nombre d'animaux mis en traitement		45	45	50
Traitement. Concentration hormonale		lot témoin	Benzoate d'œstradiol 500 γ/l	Benzoate d'œstradiol 50 γ/l
Age et stade atteints au début du traitement		25 à 30 jours st. 42-43	30 jours st. 42-43	30 jours st. 42
Durée du traitement		—	90 jours	90 jours
Durée moyenne de la vie larvaire		75 à 80 jours	110 jours	110 jours
Mortalité pendant l'élevage		8	11	15
Nombre d'animaux mis en élevage à la métamorphose		0	9	6
Nombre d'animaux fixés à la métamorphose		37	25	29
Répartition des sexes à la métamorphose	♂	16	4	6
	⚥	0	2	2
	♀	21	19	21

D'autre part, 15 animaux ont été mis en élevage, leur évolution ultérieure sera envisagée dans la quatrième partie.

A la métamorphose, le testicule des témoins, de structure homogène, contient des gonies dont les noyaux clairs et multilobés sont au repos (fig. 78, Pl. VIII). Elles sont associées à des cellules plus petites dont les noyaux basophiles apparaissent appliqués le long de leur cytoplasme. Toute la glande est enveloppée par une mince albuginée.

Les ovaires des animaux traités ont la même structure que les ovaires des animaux témoins (fig. 58 et 60, Pl. VII). La cavité ovarienne centrale est visible et le cortex contient des ovocytes dont les noyaux présentent diverses figures de la préméiose ainsi que des auxocytes dont le diamètre moyen est de 130 µ et celui de leur vésicule germinative de 85 µ.

Les gonades mâles sont reconnaissables à leur structure homogène et au fait qu'elles ne contiennent que des gonies aux noyaux clairs et multilobés mais dans la totalité des cas observés elles ne présentent pas une structure identique sur toute leur longueur. Elles peuvent ainsi devenir très minces et atteindre 30 µ d'épaisseur, ne contenant plus à ce niveau que une ou deux gonies. Elles retrouvent ensuite leur taille primitive, leur épaisseur étant comprise entre 50 et 85 µ et leur largeur entre 85 et 130 µ.

Les gonades intersexuées ont une structure homogène qui est comparable à celle des gonades mâles. Elles contiennent d'une part des gonies dont les noyaux sont au repos, d'autre part des cellules dont les noyaux présentent des figures préméiotiques. Ces dernières cellules rappellent les ovogonies observées dans le cortex ovarien mais elles n'ont pas une situation bien définie dans la gonade. Elles sont parfois groupées en nids et elles occupent une position périphérique (fig. 59, Pl. VII) ou bien elles sont dispersées à l'intérieur de la gonade au milieu des cellules germinales à noyau multilobé. Chez un individu intersexué (TA $A_{57}DK_1/13$), nous avons observé quelques auxocytes disséminés dans une gonade d'aspect mâle, seule manifestation de l'intersexualité chez cet animal. Un autre (TA $A_{57}DK_1/9$ portait des gonies en préméiose et quelques auxocytes à la surface de gonades qui avaient par ailleurs une structure de type mâle. La taille de ces auxocytes, 45 à 50 µ de diamètre en moyenne, était inférieure à celle des auxocytes observés dans les ovaires (fig. 80, Pl. VIII).

Chez les témoins mâles et femelles, les oviductes sont différenciés à la métamorphose. Ils sont reconnaissables au niveau de l'espace dianéphrétique sous l'aspect de deux filaments blanchâtres (fig. 15, Pl. II). Les coupes histologiques à ce niveau permettent d'observer les uretères primaires qui ne sont pas encore totalement involués, surmontés des lobes müllériens dans lesquels les oviductes sont en cours d'organisation et dont les noyaux des cellules sont fortement basophiles. Plus postérieurement, au niveau de la gonade

par exemple, les oviductes sont visibles du côté externe de chaque rein, au-dessus des uretères, à l'intérieur du lobe müllérien (fig. 58, Pl. VII).

Chez les animaux traités par le benzoate d'œstradiol nous avons obtenu une inhibition partielle ou complète de la différenciation des oviductes. Les deux oviductes étaient présents chez 5 animaux, l'oviducte droit chez 8 animaux et le gauche chez 5 animaux. Chez tous les autres animaux, les deux oviductes étaient absents. Seuls les ostiums étaient différenciés et s'étaient légèrement dilatés sous l'action de l'hormone administrée, le résultat dans ce cas était identique à celui obtenu chez *Triturus helveticus*. Les oviductes différenciés avaient subi l'action de l'hormone administrée, ils présentaient une hypertrophie très nette (fig. 20, Pl. II) ; la figure 62, planche VII, montre une coupe histologique au niveau de l'espace dianéphrétique chez l'animal représenté figure 20, planche II. Du côté où la différenciation de l'oviducte a été inhibée, l'uretère primaire en cours de régression est encore visible, en revanche, sur le côté opposé il est absent, cependant que l'oviducte a subi un développement très important. Sa lumière est large et sa paroi est épaisse, formée en majeure partie de cellules ciliées ; les noyaux des cellules, nombreux, ont une forme allongée, ils sont orientés radiairement alors que chaque section d'un oviducte chez un témoin ne présente que quelques noyaux de forme circulaire. Les formations glandulaires muqueuses qui existent dans l'oviducte des femelles matures ne sont pas visibles ici. La dilatation des oviductes est importante surtout dans la région antérieure, elle devient progressivement moins intense pour les régions situées postérieurement. Chez l'animal représenté figure 20, planche II, par exemple, leur largeur varie de 260 μ dans la partie antérieure à 210 μ dans la partie moyenne puis à 50 μ dans la partie postérieure au niveau de la partie antérieure du mésonéphros, cependant que les largeurs correspondantes de la lumière sont de 210 μ, 8,5 μ et 3,5 μ. Chez un animal témoin, le diamètre de l'oviducte est compris entre 20 et 30 μ (fig. 61, Pl. VII) et la lumière est peu ou pas encore individualisée. Sur la figure 59, planche VII, le lobe müllerien est visible au-dessus de l'uretère primaire, mais il ne contient pas d'oviducte, et sur la figure 60, planche VII, il n'y a ni lobe müllerien, ni oviducte au-dessus de l'uretère primaire. Ces figures correspondent aux images histologiques rencontrées chez les animaux dont la différenciation des oviductes a été inhibée.

L'élevage de 15 animaux depuis la métamorphose jusqu'à 30 mois nous a permis de constater que cette inhibition de la différenciation des oviductes est définitive chez *T. alpestris* de même que celle réalisée avec la même substance chez *Pleurodeles waltlii* (Gallien, 1954 b).

Outre l'action féminisante sur la différenciation des gonades et l'action inhibitrice sur la différenciation des oviductes, le benzoate d'œstradiol exerce chez *T. alpestris* une action pathogène au niveau du mésonéphros. Cette action s'est manifestée principalement au

moment de la métamorphose et d'une manière analogue à celle observée chez *T. helveticus*. Nous avons dû sacrifier un certain nombre d'animaux avant que leur métamorphose ne soit achevée, d'autres sont morts en cours de métamorphose. Tous présentaient de l'ascite et un œdème généralisé visible surtout au niveau de la gorge, des membres et de la queue. A la simple observation macroscopique, le mésonéphros apparaissait profondément désorganisé, sa surface était irrégulière, boursouflée par les saillies des chambres glomérulaires dilatées. Ces lésions se retrouvent sur les coupes histologiques, elles sont identiques à celles observées chez *T. helveticus* et sont caractérisées : 1) par la dilatation des chambres glomérulaires et de la lumière des tubules rénaux ; 2) par la présence, dans les tubules rénaux, d'amas éosinophiles de structure homogène ; 3) par la présence, dans les vaisseaux sanguins et dans tout le tissu conjonctif interstitiel distendu, de fines granulations éosinophiles.

Les lésions visibles sur les figures 59 et 60, planche VII, correspondent aux aspects que nous avons rencontrés chez les animaux traités par le benzoate d'œstradiol.

En résumé, chez *T. alpestris*, l'administration du benzoate d'œstradiol en solution hydro-alcoolique pendant la vie larvaire a pour résultat :

1) la féminisation partielle des gonades des mâles génétiques. Il y a, dans les lots traités, un excédent d'individus de sexe femelle, quelques autres sont de sexe mâle, enfin un petit nombre portent des gonades intersexuées ;

2) l'inhibition partielle de la différenciation des oviductes. Cependant les ostiums et les oviductes qui se différencient sont stimulés par l'hormone administrée ;

3) des lésions au niveau des reins qui provoquent, au moment de la métamorphose, l'intoxication et la mort des animaux traités.

IV. — *Pelodytes punctatus.*

Différenciation sexuelle.

Stade C (4 mm) : Pédiculisation des crêtes génitales.

Stade D (5 mm) : Pédiculisation achevée, début de constitution des gonomères les plus antérieurs.

Stade F (9 mm) : 3 ou 4 gonomères par gonade ; gonade indifférenciée constituée (fig. 53, Pl. VI).

Stade G (10 à 11 mm) : Multiplication des gonocytes ; début de la différenciation sexuelle mâle (fig. 54, Pl. VI).

Stade I (13 mm) : Début de la différenciation sexuelle femelle, premières lacunes médullaires.

Stade J (membres postérieurs en palette) : Dans les ovaires, multiplication des gonocytes, apparition de nids d'ovogonies et confluence des lacunes médullaires (fig. 55, Pl. VI).

Stade K (4 orteils visibles aux membres postérieurs) : Chez les mâles, migration des gonocytes achevée, édification des canaux du *rete testis* et des canalicules efférents.

Stade M (membres postérieurs de 6 mm de longueur) : Organisation des tubes séminifères.

Stade O (membres postérieurs de 15 mm de longueur) : Mélanophores nombreux en surface et dans la profondeur des testicules.

Dans les ovaires, apparition d'auxocytes, médulla réduite à quelques travées cellulaires.

Stade Q (membres antérieurs externes) : Dans les testicules, apparition des premières figures méiotiques.

Stade R (métamorphose achevée) : Cortex ovarien constitué d'auxocytes, cavité ovarienne virtuelle (fig. 48, Pl. VI).

Continuité entre tubes séminifères, canaux du *rete testis* et canalicules efférents (fig. 49, Pl. VI).

La différenciation sexuelle mâle directe des gonades et la *sex-ratio* des animaux témoins à la métamorphose (tableau V) nous permettent de conclure que les animaux étudiés appartenaient à une race différenciée.

Les expériences ont été réalisées sur des larves issues d'une ponte récoltée à Toulouse le 2 Mars 1957. Les larves sont écloses le 6 Mars, elles ont commencé à s'alimenter le 11 Mars. Les différents traitements ont débuté le 15 Mars, alors que les larves mesuraient 4 mm de longueur. A ce stade, les crêtes génitales sont en cours de pédiculisation. C'est seulement deux semaines plus tard, lorsque les larves mesureront 9 mm, que la gonade atteindra le stade indifférencié.

Le tableau V rassemble les renseignements concernant les lots traités et le lot témoin. La mortalité pendant la vie larvaire a été presque nulle. La métamorphose s'est effectuée pendant la période du 10 Mai au 10 Juin. Dans chaque lot, la moitié des animaux ont été sacrifiés et disséqués à ce moment cependant que les autres ont été mis en élevage.

Les résultats obtenus dans le lot Pdy $A_{57}T$ montrent que l'espèce est différenciée à la métamorphose et que les individus mâles et femelles sont en nombres sensiblement égaux. Le sexe des gonades est reconnaissable macroscopiquement. Les ovaires sont blancs, leur longueur moyenne est de 2 mm et leur largeur moyenne de 0,5 mm ; leur bord externe est festonné délimitant ainsi 2 à 3 lobes sensiblement égaux. Nous avons noté que la gonade droite est plus antérieure que la gonade gauche et qu'elle est généralement plus longue que cette dernière, ce que nous pouvons observer sur les figures de la planche III. Les testicules sont massifs et plus courts que les ovaires, leur longueur est comprise entre 0,5 mm et 1 mm. Leur surface est mamelonnée et recouverte d'un réseau pigmenté assez dense,

Malgré la différence des concentrations utilisées, les résultats obtenus dans les lots Pdy A_{57} DK_1 et Pdy A_{57} DK_3 sont tout à fait comparables. Les individus de sexe femelle sont reconnaissables macroscopiquement et sont identiques à ceux du lot Pdy A_{57} T. Dans chaque lot, un seul individu porte des testicules typiques, tous les autres présentent des gonades atypiques dont l'aspect est assez uni-

TABLEAU V. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Pelodytes punctatus* traitées par le benzoate d'œstradiol.

Lot expérimental	Pdy A_{57}T	Pdy $A_{57}DK_1$	Pdy $A_{57}DK_3$
Nombre d'animaux mis en traitement	50	50	50
Traitement. Concentration hormonale	lot témoin	Benzoate d'œstradiol 500 γ/l	Benzoate d'œstradiol 50 γ/l
Age et stade atteints au début du traitement	2 semaines 4 mm	2 semaines 4 mm	2 semaines 4 mm
Durée de la vie larvaire	70 à 102 jours	70 à 102 jours	70 à 102 jours
Durée du traitement		55 à 87 jours	55 à 87 jours
Mortalité pendant l'élevage	0	1	0
Nombre d'animaux fixés au moment de la métamorphose	24	24	26
Répartition des sexes à la métamorphose ♂	14	1	1
Répartition des sexes à la métamorphose ♀	0	10	9
Répartition des sexes à la métamorphose ♀	10	13	16
Nombre d'animaux mis en élevage	26	25	24
Nombre d'animaux autopsiés 2 mois après la métamorphose	7	17	21
Répartition des sexes	3 ♂ 4 ♀	6 ♀ 11 ♀	11 ♀ 10 ♀

forme. Celles-ci ont une longueur moyenne de 1 mm à 1,5 mm, intermédiaire entre celles des ovaires et des testicules ; elles sont plus étroites que les ovaires ou les testicules, leur largeur moyenne est comprise entre 0,2 et 0,3 mm. Leur coloration superficielle est claire, elle rappelle celle des ovaires, mais des éléments pigmentés se devinent dans la profondeur de la glande (fig. 23, Pl. III). La comparaison des résultats obtenus dans les deux lots avec ceux obtenus dans le lot témoin permet de considérer les individus porteurs de

gonades de ce type comme des mâles génétiques. L'étude histologique des gonades au moment de la métamorphose montre qu'il s'agit de gonades intersexuées.

Les ovaires des femelles témoins (fig. 48, Pl. VI) contiennent de nombreux auxocytes dont le diamètre moyen est compris entre 50 et 55 µ, ceux-ci renferment une vésicule germinative de 30 µ environ de diamètre, dans laquelle s'observent un ou plusieurs nucléoles. Les auxocytes occupent presque tout le cortex ovarien. Il existe ici et là, en position superficielle, quelques ovogonies dont les noyaux sont au repos et quelques auxocytes dont les noyaux en préméiose contiennent des chromosomes filamenteux. Le cortex ovarien s'est accru aux dépens de la cavité ovarienne ; celle-ci cependant est encore visible au niveau des lobes ovariens, ce qui confirme l'observation faite sur les gonades femelles au cours de leur différenciation pendant la vie larvaire : les sacs ovariens sont le résultat de l'involution des épais cordons médullaires auxquels les lobes ovariens correspondent par la situation et le nombre, trois ou quatre généralement.

Les testicules sont enveloppés d'une mince albuginée sous laquelle sont disposés de nombreux mélanophores, ceux-ci s'enfoncent à l'intérieur de la glande au niveau des travées conjonctives qui délimitent les tubes séminifères dans lesquels s'observent des spermatogonies primaires et secondaires ainsi que des spermatocytes de premier ordre au début de la réduction chromatique (fig. 49, Pl. VI). Les canalicules efférents, au nombre de 2 ou 3, se sont organisés à différents niveaux du testicule et se mettent en relation d'une part avec les tubes séminifères, d'autre part avec le mésonéphros, mais il n'est pas possible, à ce stade, de distinguer une voie évacuatrice continue depuis le testicule jusqu'au canal de Wolff.

Les gonades intersexuées obtenues dans les lots Pdy A_{57} DK_1 et Pdy A_{57} DK_3 ont une structure très particulière, elles comprennent deux zones distinctes : l'une centrale, l'autre périphérique. La zone périphérique contient des cellules germinales, les unes possèdent des noyaux au repos, d'autres présentent des figures caractéristiques de la préméiose, d'autres enfin sont à l'état d'auxocytes. La zone centrale contient elle aussi des cellules germinales. Elles sont groupées en amas denses, leur noyau est au repos ou bien il présente un aspect identique à celui des spermatogonies et des spermatocytes observés dans les testicules (fig. 50, 51 et 52, Pl. VI). Cependant, il existe, dans la zone centrale de quelques gonades intersexuées, des auxocytes ainsi que des cellules germinales dont les noyaux contiennent des chromosomes filamenteux caractéristiques de la préméiose ovarienne (fig. 56, Pl. VI). Les deux zones sont séparées par une couche de tissu conjonctif qui est parfois soulignée par des mélanophores, ceux-ci s'enfoncent à l'intérieur de la partie centrale et s'insinuent parmi les amas de cellules germinales (fig. 50, Pl. VI).

L'étude de la différenciation des gonades montre que les mélanophores se développent en même temps que la médulla, qu'ils se disposent sous le cortex de la gonade indifférenciée et qu'ils se répartissent ultérieurement sous l'albuginée et dans la masse testiculaire, dans la cavité du sac ovarien, et ils sont alors visibles au niveau du hile de l'ovaire, ou bien à la frontière des territoires cortical et médullaire des gonades intersexuées.

L'action du benzoate d'œstradiol pendant la différenciation des gonades a favorisé le maintien d'un certain nombre de cellules germinales dans le cortex alors que normalement au cours de la différenciation sexuelle de type mâle, les cellules germinales en totalité quittent le cortex pour pénétrer dans la partie médullaire.

Chez les animaux témoins, au moment de la métamorphose, les oviductes sont différenciés jusqu'au milieu de l'espace dianéphrétique. Les pavillons et la portion différenciée des oviductes se sont dilatés sous l'action du benzoate d'œstradiol, cette dilatation n'est cependant pas aussi intense que celle observée quelques semaines après la métamorphose (fig. 24, Pl. III).

Le traitement appliqué pendant la vie larvaire n'a pas provoqué la féminisation complète des gonades des mâles génétiques. aussi des animaux des lots Pdy A_{57} DK_1 et Pdy A_{57} DK_3 ont-ils été mis en élevage et traités après la métamorphose. 25 animaux du lot DK_1 et 24 du lot DK_3 ont reçu une injection de 125 γ de benzoate d'œstradiol en solution huileuse dans le sac lymphatique dorsal. Mais l'élevage des jeunes Pélodytes, témoins ou traités, s'est révélé très difficile et les animaux ont dû être disséqués et fixés au cours des deux mois suivants. Voici les résultats que nous avons obtenus :

17 animaux du lot DK_1 comprenaient 6 femelles et 11 intersexués, et 21 du lot DK_3 comprenaient 11 femelles et 10 intersexués. Parmi 7 animaux témoins élevés dans les mêmes conditions, il y avait 3 mâles et 4 femelles. Les individus mâles et femelles portent des oviductes visibles sur tout leur trajet (fig. 27 et 28, Pl. III). Les corps adipeux qui surmontent les testicules et les ovaires sont peu développés, leur involution est la conséquence du jeûne prolongé des animaux. Les testicules sont intensément pigmentés et leurs dimensions sont inférieures à ce qu'elles étaient chez les mâles témoins à la métamorphose. Les ovaires se sont allongés et élargis, de nombreux ovocytes mamelonnent leur surface. Les gonades intersexuées ont évolué, leur aspect se rapproche maintenant de celui des ovaires. Toutefois, il est impossible de les confondre avec les ovaires (fig. 28 et 29, Pl. III).

La réaction des oviductes à l'injection du benzoate d'œstradiol est intense, leur dilatation est considérable mais elle se manifeste parfois seulement dans les parties antérieures des canaux. Les figures 66 et 67, planche VII, représentent des coupes histologiques transversales au niveau de la partie antérieure du mésonéphros chez un mâle témoin et chez un intersexué sacrifiés deux mois après la métamorphose. Chez le premier, l'oviducte est différencié seule-

ment en partie antérieure, mais il n'est pas visible au niveau de la coupe où le lobe müllerien est seul présent. Au niveau correspondant, chez le second, l'oviducte est considérablement dilaté et sa paroi très épaisse contient des éléments glandulaires sécréteurs de mucus. L'étude histologique des gonades nous a apporté des informations concernant leur évolution après la métamorphose.

Les testicules contiennent de nombreux spermatozoïdes dont certains sont émis dans la lumière des tubes séminifères, d'autres sont visibles dans la lumière des canalicules efférents, au niveau du hile du testicule. La spermatogenèse déjà amorcée au moment de la métamorphose s'est donc poursuivie activement.

Les ovaires contiennent de nombreux ovocytes dont la taille s'est peu accrue depuis la métamorphose. Leur diamètre moyen est de 70 γ et celui de la vésicule germinative de 35 à 40 μ. La colorabilité de cytoplasme s'est considérablement accentuée ; dans la plupart des auxocytes, il est coloré en violet foncé par le glychémalun-éosine et sa structure n'est pas homogène, il existe des plages plus claires et de forme irrégulière qui lui donnent un aspect marbré. Dans d'autres ovocytes la vésicule germinative s'est rétractée au centre du follicule ovarien entraînant une partie du cytoplasme avec elle, cependant que le reste du cytoplasme en périphérie, accolé aux cellules folliculaires, forme un anneau sombre ; d'autres auxocytes enfin ont disparu, il ne reste plus à leur emplacement qu'une très fine granulation à peine colorée dans laquelle on peut distinguer quelques cellules repérables par leur noyaux. Il s'agit là sûrement de follicules atrétiques dont le contenu a été digéré par les cellules folliculaires.

Les gonades intersexuées dont le type est représenté par la figure 29, planche III, présentent un aspect histologique très comparable à celui des ovaires des animaux de même âge. Elles sont cependant moins développées que les ovaires, tant en largeur qu'en épaisseur. Les différents aspects des auxocytes observés au niveau des ovaires se retrouvent ici ; principalement ceux dont le cytoplasme est intensément coloré (fig. 57, Pl. VI). Cependant un certain nombre d'éléments permettent de distinguer ces gonades par rapport aux ovaires. Il existe, dans la partie centrale et au niveau du hile de la glande, des amas de cellules pigmentaires ainsi que des travées de tissu conjonctif, analogues à celles qui existent dans la zone centrale médullaire des ovaires en cours de différenciation, et surtout des amas de cellules germinales dont les noyaux sont quiescents. Ces cellules ressemblent à celles qui existaient dans la partie médullaire des gonades intersexuées au moment de la métamorphose. Elles sont groupées en amas d'une dizaine de cellules environ, leurs noyaux clairs contiennent un ou, plus rarement, deux nucléoles (fig. 50 et 56, Pl. VI).

Ces aspects indiquent que les gonades intersexuées observées à la métamorphose ont poursuivi leur évolution. D'une part, la zone corticale s'est développée, elle contient de nombreux auxocytes com-

parables à ceux contenus par les ovaires des animaux témoins, d'autre part, la zone médullaire s'est considérablement amenuisée. Elle n'est plus représentée que par quelques vestiges dont les uns sont d'origine somatique, ce sont les mélanophores et les travées de tissu conjonctif, et les autres sont d'origine germinale, ce sont quelques amas isolés de cellules germinales dont les noyaux sont quiescents (fig. 57, Pl. VI). Dans la partie centrale, nous n'avons pas retrouvé la trace des cellules en cours de spermatogenèse ni celle des cellules dont les noyaux présentaient des aspects préméiotiques. La présence, dans la partie centrale, de lacunes délimitées par des travées de tissu conjonctif conduit à penser qu'un certain nombre d'éléments cellulaires présents au moment de la métamorphose ont été résorbés, principalement les cellules germinales qui avaient débuté une évolution vers la différenciation gamétique mâle. Celles qui avaient débuté une évolution vers la différenciation gamétique femelle l'ont vraisemblablement poursuivie cependant que les cellules germinales quiescentes le sont restées.

Il convient toutefois de rappeler que l'évolution des gonades intersexuées, après la métamorphose, s'est déroulée chez des animaux maintenus dans de très mauvaises conditions de nutrition. Il n'est pas possible d'affirmer que ces dernières sont étrangères à la dégénérescence de certains éléments de la lignée germinale. Toutefois, la spermatogenèse s'est poursuivie chez des mâles témoins maintenus dans les mêmes conditions.

En conclusion, le traitement par le benzoate d'œstradiol pendant la vie larvaire entraîne la féminisation partielle des gonades des mâles génétiques ; la poursuite du traitement par le benzoate d'œstradiol au-delà de la métamorphose n'a pas permis d'obtenir l'inversion complète des gonades des mâles génétiques. Ces gonades contiennent de nombreux auxocytes mais quelques amas de cellules germinales entourés de travées conjonctives et de pigment sont encore présents dans la partie centrale de la glande.

V. — *Salamandra salamandra.*

Série expérimentale I.

Protocole expérimental :

— Origine : larves pondues au laboratoire en Février 1962 par une femelle capturée en forêt de Marly, l'automne précédent.

— Lots : un lot témoin, SA A_{62} T, constitué par 10 larves ;
un lot traité, SA A_{62} DK_1, constitué par 14 larves.

— Nature du traitement : Benzoate d'œstradiol à la concentration de 600 γ/l.

— Durée du traitement : de 70 à 80 jours.

— Etat du développement des gonades au début du traitement : deux larves fixées à la naissance, le 5.II.1962, ont été étudiées, elles mesuraient 18 mm de long et leurs membres postérieurs portaient

5 doigts bien formés. Les gonades sont différenciées sur la totalité de leur longueur, ce sont des testicules, les gonocytes occupent une position centrale entourés de cellules somatiques d'origine médullaire, la paroi externe de ces glandes est stérile à l'exception de quelques rares gonocytes qui occupent une position corticale et ceux-ci ne s'observent qu'aux niveaux les plus postérieurs des gonades. Deux autres larves au même stade de développement appartenant à une autre ponte portaient des ovaires bien différenciés, à cavité nettement visible, dont les ovogonies étaient en cours de multiplication.

Résultats :

A la métamorphose, le lot témoin comprend : 5 ♀ et 5 ♂, le lot traité : 7 ♀ et 7 individus reconnus macroscopiquement comme des mâles mais dont les gonades ont une structure atypique.

Analyse :

A la métamorphose, chez les témoins, le sexe est identifiable macroscopiquement après la dissection de l'animal. La longueur moyenne des gonades, ovaires ou testicules, est comprise entre 3,5 mm et 4 mm. Les testicules apparaissent comme deux bandelettes très étroites ; dans la majorité des cas observés, ils sont masqués par les corps adipeux le long du côté externe desquels ils s'étirent. Les ovaires occupent la même situation mais ils sont plus larges et plus épais que les testicules, ils débordent latéralement les corps adipeux, ce qui les rend très visibles et facilement reconnaissables.

La structure du testicule est homogène (fig. 74, Pl. VIII). Les cellules germinales sont réparties isolément dans l'ensemble du testicule parmi les cellules somatiques. Le testicule est entouré d'une membrane très distincte, elle correspond à la partie corticale involuée de la gonade indifférenciée. Un ou deux nucléoles et de fines granulations colorés en violet par le glychémalun-éosine sont visibles dans les noyaux des cellules germinales.

Les ovaires présentent une cavité ovarienne typique (fig. 73, Pl. VIII) dont la lumière est le plus souvent réduite. La paroi ovarienne contient de nombreuses ovogonies en cours de multiplication et rassemblées en nids de quelques cellules, limités par les futures cellules folliculaires dont les noyaux très aplatis sont facilement reconnaissables. Nous n'avons pas observé d'auxocytes ni de noyaux dont l'aspect correspond aux stades de la préméiose, particulièrement les stades synaptiques qui sont généralement rencontrés au moment de la métamorphose dans les ovaires des autres espèces étudiées. Les noyaux des ovogonies sont de forme arrondie, ils sont généralement colorés en violet pâle, de façon homogène, par le glychémalun-éosine, ils contiennent en outre de fines granulations plus sombres. Un ou deux nucléoles sont généralement visibles dans chaque noyau.

L'étude histologique des gonades des animaux du lot SA A_{62} DK_1 montre qu'il n'y a pas de différence entre la structure des ovaires dans ce lot et celle des ovaires dans le lot témoin. En revanche, la structure des testicules diffère sensiblement de celle des testicules des animaux témoins.

La paroi externe du testicule correspondant à la future membrane albuginée est devenue plus épaisse (fig. 75, Pl. VIII) et les noyaux des cellules y ont acquis une disposition particulière. Ces noyaux sont de forme ovoïde ; chez les mâles témoins, leur grand axe est généralement orienté parallèlement à la surface du testicule ; chez les animaux traités, l'orientation est différente et leur grand axe est perpendiculaire à la surface de la glande (comparer les figures 74 et 75, Pl. VIII). Cette orientation particulière des noyaux se retrouve d'ailleurs dans les ovaires typiques au niveau du cortex, dans les régions où celui-ci est stérile.

Dans l'ensemble de la gonade, les cellules germinales sont moins nombreuses que chez les mâles témoins. Bien que la plupart des cellules germinales soient situées dans la région centrale des testicules, de place en place, le long de la gonade quelques-unes occupent une position superficielle et les noyaux des cellules de la paroi corticale sont visibles étroitement appliqués à la surface de leur cytoplasme. L'aspect des noyaux des cellules germinales qui sont situées en position superficielle ne diffère pas sensiblement de celui des noyaux des gonies qui occupent une position profonde. La présence de quelques cellules germinales en position superficielle ne confère pas à ces gonades un aspect intersexué indubitable. On assiste plutôt ici à une ébauche d'intersexualité. Nous verrons plus loin que ceci tient au fait que la différenciation des gonades était déjà fort avancée lorsque le traitement fut institué.

A la métamorphose, les oviductes sont partiellement différenciés chez les témoins mâles et femelles. Les ostiums sont bien visibles et les oviductes proprement dits atteignent en général le milieu de l'espace dianéphrétique, certains atteignent même l'extrémité antérieure du mésonéphros. Chez les animaux du lot SA A_{62} DK_1, les oviductes ne sont représentés que par leurs parties ostiales. Celles-ci sont dilatées par rapport à celles des animaux témoins et elles se terminent en cul-de-sac étant donnée l'absence totale des oviductes dont la différenciation a été inhibée par le traitement hormonal.

L'action de l'hormone administrée à un stade plus précoce du développement est démontrée par la série expérimentale suivante.

Série expérimentale II.

Protocole expérimental :

— Origine : larves extraites, pendant l'automne, des oviductes de femelles récemment capturées.

— Lots : un lot témoin, SA D_{62} T, constitué par 25 larves provenant d'une femelle ;
un lot traité, SA C_{62} DK_2, constitué par 20 larves provenant d'une autre femelle ; 4 larves supplémentaires de cette femelle ont été fixées au début du traitement (le 26.X.62).
— Nature du traitement : Benzoate d'œstradiol à la concentration de 600 γ/l.
— Durée du traitement : de 110 à 125 jours.
— Mortalité : 3 animaux du lot SA D_{62} T pendant la vie larvaire.
— Etat du développement des gonades au début de l'expérience : deux des 4 larves fixées le 26.X.1962 ont été étudiées, elles mesuraient 15 mm de long et leurs membres postérieurs portaient le bourgeon du cinquième doigt. La première présente des gonades dont la structure correspond au type de la gonade indifférenciée ; les gonocytes occupent une position corticale, ils entourent les cordons du *rete* bien visibles au niveau du hile et dans la partie centrale de la glande. Chez cet animal, 3 gonocytes seulement occupant une position médullaire ont été observés, d'autre part, sur l'une des gonades, une amorce de cavité ovarienne était visible au niveau de quelques coupes. Les gonades de la seconde larve ont une structure comparable mais les gonocytes qui occupent une position médullaire sont beaucoup plus nombreux et ils se rencontrent conjointement avec des gonocytes situés en position corticale.

En conclusion, les gonades des deux larves SA C_{62} T_1 et T_2 présentent les stades du début de la différenciation sexuelle. Il est difficile de préciser l'orientation de l'évolution chez la première larve ; chez la seconde, la différenciation sexuelle est de type mâle, elle est caractérisée par la migration des gonocytes à partir du cortex vers les cordons médullaires ; cependant la présence de gonocytes à la fois en position superficielle et en position profonde montre que leur migration n'était pas encore achevée.

Le début de la différenciation sexuelle se situe donc chez *Salamandra salamandra* à un stade de développement qui est sensiblement comparable à celui de *Pleurodeles* et de *Triturus alpestris*. Ce stade est caractérisé par l'apparition de l'ébauche du cinquième doigt du membre postérieur (stade 53 chez *Pleurodeles*).

Résultats :

A la métamorphose, le lot témoin comprenait 12 ♀ et 10 ♂, le lot traité 13 ♀ et 7 intersexués.

Analyse :

Chez les témoins, les canaux de Müller étaient partiellement différenciés, leur extrémité postérieure étant comprise entre le milieu de l'espace dianéphrétique et le début du mésonéphros. Chez les animaux du lot SA C_{62} DK_1, les canaux de Müller ne s'étaient pas différenciés et seuls les ostiums légèrement dilatés étaient visibles.

Parmi les 20 animaux du lot SA C_{62} DK_1, 9 femelles étaient identifiables d'après l'aspect de leurs gonades, comparable à celui des ovaires des animaux témoins. Par contre, chez 11 animaux, le sexe était difficilement identifiable. Les gonades, tout en ayant l'aspect de bandelettes étroites, présentaient sur leur longueur des zones plus larges et plus épaisses. L'étude histologique des gonades a permis de distinguer 4 individus de sexe femelle et 7 individus intersexués.

La structure des ovaires est comparable à celle rencontrée chez les femelles des lots SA A_{62} T et SA A_{62} DK_1 et représentée figure 73, planche VIII. La structure des gonades des individus intersexués possède une allure particulière qui la distingue des différentes organisations des gonades que nous avons observées jusqu'ici chez *Salamandra*.

Ces gonades ont dans l'ensemble une structure compacte, elles sont constituées d'une partie centrale entourée d'une couche superficielle. Des cellules germinales sont visibles dans la partie centrale, celle-ci n'atteint cependant jamais la largeur ni l'épaisseur d'un testicule et le nombre de cellules germinales qu'elle contient et qui sont visibles sur chaque coupe transversale est de l'ordre de 3 ou 4.

La couche cellulaire superficielle est épaisse, elle est comparable à celle déjà observée chez les individus mâles du lot SA A_{62} DK_1, les cellules germinales y sont toutefois beaucoup plus nombreuses, et à la différence de celle-ci, elle est parfois interrompue ; elle n'enveloppe pas complètement la partie centrale, les cellules germinales qu'elle contient et sur lesquelles sont appliqués les noyaux des cellules corticales sont alors en saillie à la surface de la glande donnant à celle-ci, sur les coupes histologiques, un contour crênelé ou irrégulier (fig. 76, Pl. VIII). A différents niveaux des gonades la couche corticale devient continue, celles-ci prennent alors un aspect intersexué aisément reconnaissable. C'est le cas de la coupe histologique représentée sur la figure 77, planche VIII, la partie centrale de la glande est constituée par 3 cellules germinales dont le cytoplasme clair est bordé par les noyaux de forme aplatie des cellules somatiques et elle est recouverte d'une pellicule corticale où se reconnaissent des cellules germinales bordées de cellules folliculaires. La limite entre les deux parties constitutives de la glande est soulignée par la présence de cellules somatiques bien visibles au niveau de la coupe sur le côté gauche.

Les noyaux des cellules germinales sont comparables à ceux des cellules germinales observées au niveau des testicules ou des ovaires des animaux des autres lots. Des cellules germinales à gros noyaux clairs et lobés sont parfois présentes et elles s'observent alors seulement en position profonde, près du hile de la glande (fig. 76, Pl. VIII). Etant donnée l'absence de figures préméiotiques dans les cellules germinales des ovaires chez les femelles témoins au moment de la métamorphose ainsi que dans les cellules germinales situées en position superficielle, il est difficile d'attribuer ou

non, à ces dernières un caractère ovarien. Cependant, chez trois individus, nous avons observé, entourés de cellules folliculaires, quelques groupes de cellules germinales, généralement au nombre de 4. Il s'agit sans doute d'ovogonies qui sont au début de leur période de multiplication et qui sont disposées en petits nids. Trois noyaux des cellules germinales d'un de ces nids sont visibles à l'apex de la gonade sur la figure 76, planche VIII ; la quatrième cellule est visible sur la coupe voisine.

La disparition des cellules germinales dans la partie centrale devient parfois complète, il existe alors l'amorce d'une cavité ovarienne. C'est l'aspect le plus proche d'une structure ovarienne que nous ayons observé, mais cette disposition est rare et nous ne l'avons rencontrée sur une courte portion des gonades que chez 2 animaux parmi les 7 étudiés.

L'intersexualité obtenue dans cette série expérimentale est plus prononcée que celle obtenue dans la première série.

La différence s'explique par le fait que le traitement, dans chaque expérience, n'a pas débuté au même stade du développement des larves.

Tout se passe comme si le traitement par le benzoate d'œstradiol avait pour résultat l'arrêt du processus de migration des gonocytes depuis la région corticale vers la région médullaire centrale de la gonade indifférenciée et la stimulation du cortex, même lorsque celui-ci est stérile. Cette stérilité n'est pas due à la toxicité du benzoate d'œstradiol à l'égard des cellules germinales puisque celles-ci ont été maintenues dans le cortex au cours d'une autre expérience réalisée avec des concentrations hormonales identiques et puisque, d'autre part, le développement des ovaires chez les femelles est normal.

Les résultats obtenus chez *Salamandra* confirment l'importance que revêt, au cours des expériences d'inversion expérimentale du sexe, le degré de développement atteint par les gonades au moment où est instauré le traitement.

En conclusion, le benzoate d'œstradiol administré pendant la vie larvaire chez *Salamandra salamandra,* a provoqué la féminisation partielle des mâles génétiques.

VI. — *Bombina variegata.*

Différenciation sexuelle.

Larves de 6 mm : crêtes génitales paires, pédiculisées.
plaquettes vitellines abondantes dans les gonocytes.

Larves de 9 à 10 mm : stade de la gonade indifférenciée.

Larves de 11 mm (bourgeons des membres postérieurs cylindriques de 1 mm de longueur) : début de la différenciation sexuelle mâle dans la partie antérieure des crêtes génitales.

Larves de 14 à 15 mm (membres postérieurs en palette festonnée de 1,5 mm de longueur).	: différenciations sexuelles mâle et femelle achevées. Structure caractéristique que l'on retrouve à la métamorphose.

Les animaux que nous avons étudiés appartenaient à une race différenciée ; il y a autant de mâles que de femelles parmi les animaux témoins à la métamorphose (Tableau VI) et la différenciation sexuelle mâle s'effectue directement sans passer par une phase ovarienne (1).

Protocole expérimental.

— Origine : Ponte de 27 œufs obtenue le 26.XII.1956, après l'injection de broyats d'hypophyses fraîches.
— Nombre de larves traitées : 20 larves, lot BO $C_{56}DK_1$.
— Début du traitement : le 9.I.1957 ; larves de 5,5 mm de longueur.
— Nature du traitement : Benzoate d'œstradiol à la concentration de 500 γ/l.
— Lots témoins : En raison du petit nombre de larves de la ponte, un lot témoin n'a pas été isolé à partir de celle-ci ; les lots témoins (31 larves) des pontes BO A_{56} et BO B_{56} (voir tableau VI) nous ont servi de référence.

Résultats.

— Lots témoins : mortalité pendant la vie larvaire : 12 ; répartition des sexes à la métamorphose : 10 ♂ et 9 ♀.
— Lot traité : mortalité pendant la vie larvaire : 6 ; répartition des sexes à la métamorphose : 6 ♂ et 8 ♀.

Chez les témoins, le sexe des gonades est reconnaissable macroscopiquement, au moment de la métamorphose, après la dissection des animaux (fig. 3). Les ovaires sont de forme allongée et de coloration blanchâtre, ils mesurent en moyenne 1,5 mm de long. De légers étranglements dont le nombre varie de 4 à 6 sont répartis sur toute leur longueur et dessinent des lobes discrets. Les testicules sont plus courts, ils mesurent 1 mm de long en moyenne, leur contour est régulier et leur forme cylindrique est effilée vers l'arrière. Leur surface est généralement de couleur blanchâtre, elle est parfois recouverte de cellules pigmentaires qui forment des arborisations et lui donnent une coloration grise.

Sur les coupes histologiques transversales des ovaires, la cavité ovarienne est bien visible, limitée par les cellules du sac ovarien ; le cortex contient de nombreux nids d'ovogonies entourés de cellules folliculaires. Les stades synaptiques sont reconnaissables au niveau de certains nids d'ovogonies, toutes les ovogonies d'un même nid se trouvent au même stade évolutif. Des auxocytes se rencontrent exceptionnellement dans les ovaires au moment de la métamorphose (fig. 64, Pl. VII).

(1) Une telle phase ovarienne existe dans la race italienne indifférenciée de *Bombina pachypus* étudiée par Vannini (1947).

La structure des testicules apparaît plus homogène. Sur les coupes transversales, leur contour est circulaire. Les spermatogonies primaires sont aisément reconnaissables grâce à leurs noyaux de grande taille (environ 18 μ) clairs et multilobés contenant plusieurs nucléoles, elles sont réparties parmi les cellules somatiques dans l'ensemble de la gonade, celle-ci est limitée extérieurement par une albuginée très distincte (fig. 65, Pl. VII). Sur les coupes histologiques, des lacunes apparaissent, elles correspondent à la lumière de tubes séminifères en cours d'organisation autour de laquelle sont

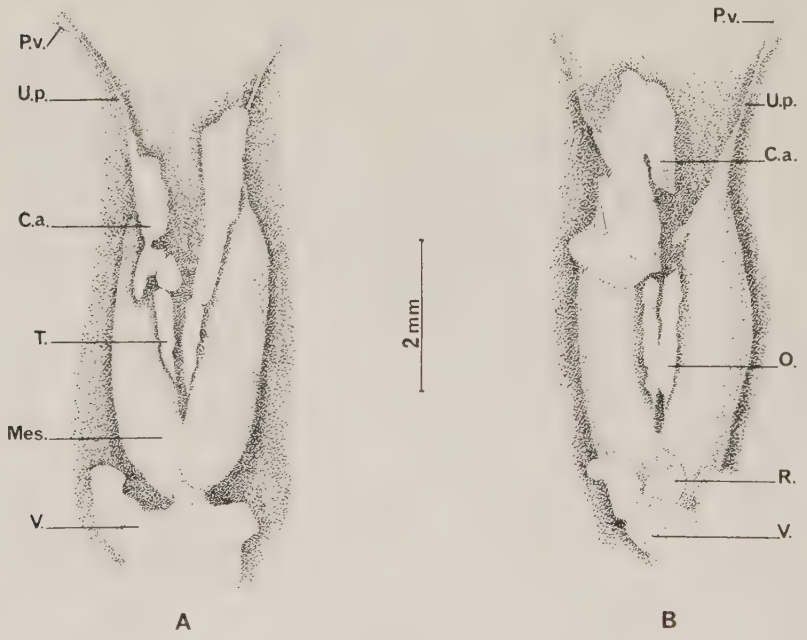

Figure 3.

Aspect des gonades chez *Bombina variegata* à la métamorphose (dessins à la chambre claire).

A. Testicules chez un mâle du lot BO B_{56} EK_1 traité par le propionate de testostérone, identiques à ceux d'un mâle témoin.

B. Ovaires chez une femelle du lot BO B_{56} EK_1 traitée par le propionate de testostérone, identiques à ceux d'une femelle témoin.

C.a. : corps adipeux (partiellement reséqués), Mes. : mésonéphros, O. : ovaire, P.v. : pavillon de l'oviducte, R. : rectum, T. : testicule, U.p. : uretère primaire, V : vessie.

réparties des cellules somatiques et des spermatogonies dont certaines se sont multipliées et sont groupées en amas de spermatogonies secondaires dont les noyaux plus petits (9 à 10 μ) ont un contour arrondi et sont colorés en violet par le glychémalun-éosine. Les amas sont entourés par des cellules qui deviendront ultérieurement les cellules de Sertoli.

Chez les animaux traités par l'hormone femelle, l'étude histologique des gonades a permis de reconnaître les structures typiques des testicules et des ovaires, elles étaient tout à fait superposables à celles observées chez les animaux témoins (fig. 64 et 65, Pl. VII).

Chez les animaux témoins, seuls les pavillons des oviductes sont différenciés au moment de la métamorphose. Ils atteignent le niveau des pronéphros qui sont en cours de dégénérescence et à ce niveau les uretères primaires, également en cours de dégénérescence, sont surmontés sur une courte distance par des éléments à partir desquels se différencieront ultérieurement les oviductes et qui sont repérables sur les coupes transversales sous l'aspect d'amas de 4 à 6 noyaux cellulaires disposés ventralement par rapport aux uretères. Macroscopiquement, les pavillons des oviductes et les uretères apparaissent comme de fins tractus blanchâtres en continuité l'un avec l'autre (fig. 3 A et 3 B). Chez les animaux traités par le benzoate d'œstradiol, nous n'avons observé aucune accélération de la différenciation des oviductes par rapport aux animaux témoins ni aucune réaction des pavillons déjà différenciés.

En conclusion, l'application d'un traitement par le benzoate d'œstradiol pendant la vie larvaire, à la concentration de 500 γ/l, ne provoque aucune réaction des canaux de Müller qui se trouvent, comme chez les témoins, au tout début de leur différenciation au moment de la métamorphose ni aucune modification de la différenciation des gonades mâles et femelles dont l'aspect extérieur et la structure sont identiques à ceux des gonades d'animaux témoins au même stade.

B. — ACTION DE L'HORMONE MALE. (PROPIONATE DE TESTOSTERONE).

Les expériences ont été effectuées avec le propionate de testostérone administré en solution hydro-alcoolique. Chez *Pelobates cultripes*, une série expérimentale complémentaire a été traitée au moyen d'injections d'une solution huileuse d'acétate de testostérone. Selon la façon dont elles ont réagi à l'action du traitement hormonal, nous avons réparti les espèces éprouvées en deux groupes :

1) les espèces où l'hormone mâle n'a aucune action sur l'organogenèse des gonades et du rein : *Bombina variegata, Pelobates cultripes, Pelodytes punctatus* et *Salamandra salamandra*. A la métamorphose on trouve, dans les lots expérimentaux comme dans les lots témoins, un nombre sensiblement égal d'individus mâles et femelles.

2) les espèces où l'hormone mâle a une action inhibitrice sur l'organogenèse des gonades et du rein : *Triturus helveticus* et *Triturus alpestris*.

Chez ces deux espèces, l'hormone mâle s'est révélée toxique. La différenciation du mésonéphros est altérée, les animaux manifestent

de l'ascite et ils sont intoxiqués par les déchets qu'ils ne peuvent éliminer ; d'autre part, ils s'alimentent difficilement à cause de la gêne mécanique exercée par l'ascite. Malgré les ponctions fréquentes effectuées sur les animaux qui étaient les plus atteints, très peu ont survécu jusqu'à la métamorphose. A ce moment, les animaux de sexe femelle sont reconnaissables, cependant que d'autres, en nombre sensiblement égal portent des gonades réduites à l'état de très minces bandelettes vestigiales. Ces derniers individus correspondent aux mâles génétiques.

Chez la plupart des espèces traitées, l'administration d'hormone mâle a provoqué la manifestation précoce, dès la métamorphose, de certains caractères sexuels somatiques quelle que soit par ailleurs l'action qu'elle a exercée sur la différenciation des gonades.

I. — *Bombina variegata.*

Deux pontes, BO A_{56} et BO B_{56}, obtenues après des injections d'hypophyses fraîches de *Rana temporaria* à des *Bombina* adultes conservés au laboratoire, ont été utilisées. Les renseignements concernant les conditions expérimentales sont rassemblées dans le tableau VI.

TABLEAU VI. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Bombina variegata* traitées par le propionate de testostérone.

Lot	Traitement Concentration hormonale	Début du traitement, date, âge, longueur des larves	Nombre d'animaux mis en traitement	Durée du traitement jusqu'à la métamorphose	Mortalité pendant l'élevage	Fixés à la métamorphose	Répartition des sexes à la métamorphose		
							♂	☿	♀
BO A_{56} T	lot témoin	16 Mai 1956 17 jours 6 mm	13	45 jours	5	8	3	0	5
BO A_{56} EK_1	Propionate de testostérone 500 γ/l	16 Mai 1956 17 jours 6 mm	20	60 jours	7	13	6	0	7
BO B_{56} T	lot témoin	21 Déc. 1956 12 jours 5,5 mm	18	70 jours	7	11	7	0	4
BO B_{56} EK_1	Propionate de testostérone 500 γ/l	21 Déc. 1956 12 jours 5,5 mm	52	85 jours	14	18 (et 20 animaux mis en élevage)	11	0	7

La comparaison des durées de la vie larvaire dans les divers lots permet de constater que dans chaque lot traité par l'hormone mâle BO $A_{56}EK_1$ et BO $B_{56}EK_1$, la vie larvaire a été plus longue que dans le lot témoin correspondant. Le délai, de l'ordre de deux semaines

environ, pour obtenir la métamorphose, peut être attribué à une action retardatrice de l'hormone mâle. En effet, la durée de la vie larvaire du lot BO $C_{56}DK_1$ traité par le benzoate d'œstradiol est sensiblement égale à celle du lot BO $B_{56}T$ élevé pendant la même période, dans les mêmes conditions d'entretien, au traitement hormonal près.

La mortalité en cours d'élevage a été sensiblement du même ordre dans tous les lots, quoique plus faible dans le lot BO $B_{56}EK_1$.

3 animaux du lot BO $B_{56}EK_1$ qui avaient subi un retard important dans leur développement ont été autopsiés alors qu'ils ne présentaient que des signes précurseurs de la métamorphose tels que l'apparition d'un membre antérieur ou bien le changement d'aspect du revêtement cutané.

20 animaux métamorphosés du lot BO $B_{56}EK_1$ ont été mis en élevage (lot BO $B_{56}EK_1/M$), nous les étudierons plus loin.

Action sur les gonades.

Dans les lots témoins et les lots traités, les mâles et les femelles sont en nombre sensiblement égal. L'aspect des gonades est celui qui a déjà été décrit ci-dessus (cf. p. 51). La figure 3 représente les testicules et les ovaires de deux animaux du lot BO $B_{56}EK_1$ et elle correspond aux aspects des gonades mâles et femelles les plus généralement rencontrés, aussi bien dans les lots témoins que dans les lots traités par le propionate de testostérone ou le benzoate d'œstradiol.

L'étude histologique des gonades des animaux traités par l'hormone mâle n'a permis de déceler aucune différence par rapport à celles des témoins (fig. 64 et 65, Pl. VII). Leur structure est la même, la cavité ovarienne est présente, les noyaux cellulaires synaptiques sont visibles dans les nids d'ovogonies du cortex ovarien et chez deux individus seulement nous avons observé quelques rares auxocytes. La structure des testicules est plus homogène que celle des ovaires, leur contour apparaît presque circulaire sur les coupes transversales, ils sont entourés d'une albuginée assez épaisse et les spermatogonies primaires sont réparties dans la glande parmi les cellules d'origine somatique.

En résumé, nous n'avons relevé au moment de la métamorphose, aucune action, au niveau des gonades, du propionate de testostérone administré.

Action sur les caractères sexuels somatiques.

L'action du propionate de testostérone s'est manifestée d'une façon spectaculaire au niveau des caractères sexuels somatiques mâles.

Chez *Bombina variegata*, le mâle en rut porte un revêtement cutané hérissé de courts « piquants » kératinisés de couleur sombre sur les régions dorsales des membres, le dos et la tête et d'autre part, sur les membres, de petites surfaces kératinisées dont la localisa-

tion est très précise : à la face interne des avant-bras, à la base du premier doigt interne sur le tubercule carpien, à la face interne des premières phalanges des deux doigts internes ainsi que sur la face inférieure des deuxième et troisième orteils internes, parfois même du quatrième orteil.

Chez tous les animaux traités par l'hormone mâle, nous avons observé au moment de la métamorphose la présence des coussinets kératinisés au niveau des avant-bras et à la base du premier doigt, même chez un têtard dont les membres antérieurs étaient encore emprisonnés à l'intérieur des opercules. Les autres localisations étaient beaucoup plus rarement rencontrées.

Les trois têtards dont nous avons parlé précédemment et qui ont été sacrifiés avant l'achèvement de leur métamorphose ont présenté des structures intéressantes. Chez eux, les réactions de kératinisation étaient beaucoup plus importantes que chez leurs congénères. Les figures 13, 14 et 10, planche I, représentent le membre antérieur droit, le pied droit et l'aspect du revêtement cutané dorsal de l'un d'entre eux que l'on peut comparer avec les parties correspondantes d'un animal témoin à la métamorphose. La figure 14 permet de constater, au niveau du pied, la présence d'un coussinet kératinisé à la base du premier orteil interne ainsi que la présence d'étuis cornés à l'extrémité des orteils ; de tels étuis ont été également rencontrés à l'extrémité des orteils chez un autre têtard. Leur étude histologique montre qu'ils sont produits par une exfoliation intense de kératine localisée à l'extrémité de la dernière phalange mais la desquamation étant plus lente que la production de kératine, il en résulte une accumulation qui simule la présence de griffes et qui n'est pas sans présenter quelque analogie avec les « griffes » que l'on rencontre chez les individus mâles et femelles de *Xenopus laevis*, cependant chez cette espèce elles n'existent qu'à l'extrémité des trois premiers orteils et leur existence ne dépend pas de la présence de l'hormone mâle. L'étude histologique des coussinets kératinisés des avant-bras montre qu'il s'agit essentiellement d'une exfoliation intense de la kératine à ce niveau qui n'est pas accompagnée, comme chez *Rana temporaria*, d'un développement simultané important des éléments glandulaires cutanés. L'étude histologique du revêtement cutané montre que les petits cônes kératinisés qui le hérissent sont situés au sommet de petits mamelons correspondant à la présence de glandes cutanées sous-jacentes. Chez les individus traités par l'hormone mâle les mamelons sont plus saillants et les tubercules coniques kératinisés sont plus importants que chez les témoins, ainsi sur la figure 10, planche I, il est possible de distinguer des petits tubercules qui entourent un tubercule central beaucoup plus grand. L'étude histologique n'a cependant pas permis de déceler un développement particulier des glandes à leur niveau.

Ces observations nous montrent que, dès la métamorphose, chez *Bombina variegata*, des caractères sexuels somatiques mâles sont compétents, ils réagissent spécifiquement à l'administration de l'hor-

mone mâle. La variation de l'intensité de la réponse des animaux traités tient au fait que la plupart des animaux ont été isolés dès l'apparition des membres antérieurs et soustraits jusqu'à l'achèvement de la métamorphose à l'action de l'hormone mâle, celle-ci n'a pu agir sur les organes récepteurs que pendant une durée relativement courte par rapport à celle pendant laquelle elle a agi chez les trois têtards dont la métamorphose a été tardive et lente et qui ont été maintenus plus longtemps dans la solution hormonale. Chez eux la réponse des caractères sexuels somatiques a été particulièrement intense et l'action prolongée de l'hormone mâle a même provoqué l'apparition de structures inhabituelles telles que le coussinet kératinisé à la base du premier orteil et les étuis kératinisés à l'extrémité des orteils.

Traitement après la métamorphose.

20 animaux métamorphosés du lot $B_{56}EK_1$ ont été mis en élevage. Ils ont reçu 4 injections d'une solution huileuse d'acétate de testostérone ; au cours de chacune d'elles, chaque animal a reçu environ 500 γ d'acétate de testostérone. Les 4 injections ont été effectuées à 1 mois d'intervalle. Pendant la période des injections les animaux ont conservé les coussinets kératinisés qu'ils possédaient à la métamorphose. 9 animaux maintenus en élevage pendant près de 3 années ont été autopsiés, ils comprenaient 6 femelles et 3 mâles, 7 animaux morts en cours d'élevage, disséqués et fixés comprenaient 4 femelles et 3 mâles. 4 animaux morts en cours d'élevage n'ont pas été disséqués. Au total, parmi les 16 animaux autopsiés il y avait 10 femelles et 6 mâles dont les gonades étaient tout à fait comparables à celles d'animaux témoins de même âge.

Conclusion.

Le propionate de testostérone et l'acétate de testostérone, administrés pendant la vie larvaire et après la métamorphose, n'ont exercé aucune action sur la différenciation sexuelle ni sur l'évolution ultérieure des gonades chez *Bombina variegata*. En revanche, ils ont provoqué une réaction de la part de certains caractères sexuels somatiques mâles qui sont compétents dès le stade de la métamorphose. A cet égard, la réaction de *Bombina variegata* est comparable à celles de *Discoglossus pictus* (Gallien, 1950 d) et de *Bufo americanus* (Chang, 1955) ; elle se distingue de celle de *Rana temporaria* où, sur le membre antérieur, le territoire correspondant aux brosses copulatrices ne devient compétent que 3 à 4 mois après la métamorphose (Gallien, 1944).

II. — *Pelobates cultripes.*

Deux expériences ont été réalisées ; dans l'une du propionate de testostérone a été administré en solution hydro-alcoolique, dans

l'autre de l'acétate de testostérone en solution huileuse a été injecté. Les renseignements concernant ces expériences ainsi que les résultats sont rassemblés dans le Tableau VII.

TABLEAU VII. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Pelobates cultripes* traitées avec de l'hormone mâle.

	Elevages en cuvettes (hormone en solution hydro-alcoolique)			Elevages dans de grands aquariums (hormone en solution huileuse)	
Lot expérimental	Pba $A_{57}T$	Pba $A_{57}EK_1$	Pba $A_{57}EK_3$	Pba $C_{57}T$	Pba $B_{57}EK$
Début du traitement. Age, taille	15 jours 5 mm	15 jours 5 mm	15 jours 5 mm	98 jours 22 mm	104 jours 20 mm
Traitement hormonal. Concentrations	lot témoin	Propionate de testostérone 500 γ/l	Propionate de testostérone 50 γ/l	lot témoin	Acétate de testostérone (2 injections) 700 γ/animal
Nombre d'animaux traités	50	50	50	60	40
Mortalité pendant l'élevage	36	33	27	0	3
Durée de la vie larvaire	121 jours à 165 jours	131 jours à 160 jours	145 jours	122 jours à 166 jours	150 jours à 166 jours
Animaux métamorphosés mis en élevage	0	0	10	40	25
Animaux métamorphosés fixés	14	17	13	20	12
Répartition des sexes ♂	7	8	6	9	6
Répartition des sexes ♀	0	0	0	0	0
Répartition des sexes ♀	7	9	7	11	6

Première expérience (lots Pba $A_{57}T$, Pba $A_{57}EK_1$ et Pba $A_{57}EK_3$).

Nous retrouvons, dans les lots A_{57} EK_1 et EK_3, la forte mortalité que nous avons déjà observée quand les têtards ont été élevés dans de faibles volumes d'eau. Elle est du même ordre de grandeur que la mortalité survenue dans le lot témoin. Parmi les animaux qui se sont métamorphosés les individus des deux sexes sont en nombre sensiblement égal. Les femelles portent des bandelettes ovariennes godronnées et les mâles portent des testicules courts et rectilignes identiques aux gonades des animaux témoins (fig. 30 et 31, Pl. IV).

Seconde expérience (lots Pba $B_{57}EK$ et Pba $C_{57}T$).

Le 12.VI.1957, 40 animaux ont reçu chacun une première injection de 300 γ d'acétate de testostérone en solution huileuse puis le

28.VI.1957, une seconde injection de 630 γ par animal a été réalisée. Nous évaluons la quantité totale moyenne reçue par chaque têtard au cours de ces opérations à 700 γ.

25 animaux ont été placés en élevage dès la métamorphose, 12 autres ont été disséqués et fixés, il y avait parmi eux 6 mâles et 6 femelles. Des traces d'huile ont été retrouvées au moment de la dissection sous la peau de la gorge chez 11 animaux.

Alors que chez les animaux témoins des deux sexes les canaux de Müller sont différenciés et bien visibles à la métamorphose (fig. 30 et 31, Pl. IV) nous avons remarqué, à la suite des deux expériences, que l'hormone mâle a exercé une action inhibitrice sur ces canaux qui ne sont plus visibles que sous la forme de très fins tractus.

L'étude histologique des gonades mâles et femelles permet de constater que leur structure est en tout point comparable à celle observée chez les témoins. Les ovaires présentent une cavité ovarienne très distincte et contiennent quelques auxocytes et de nombreux ovocytes en préméiose. La structure des testicules montre le début de l'organisation des tubes séminifères ; des amas de spermatogonies sont séparés par des travées de cellules somatiques qui confluent dans la partie centrale de la glande et qui formeront ultérieurement les cloisons des tubes séminifères. Les spermatogonies sont reconnaissables grâce à leur grande taille et à leur noyau lobé très clair qui contient 2 ou 3 nucléoles.

Parmi les animaux métamorphosés mis en élevage quelques uns ont été disséqués et fixés. Ils comprenaient 2 mâles et 1 femelle dans le lot $A_{57}EK_3$ et 5 mâles et 5 femelles dans le lot $B_{57}EK$.

Ainsi que nous l'avons signalé plus haut (p. 30) deux animaux du lot Pba $A_{57}EK_1$ ont présenté de l'ectrodactylie au niveau des membres postérieurs. Le membre postérieur droit de l'un d'eux est représenté sur la figure 6, planche I. Le tubercule métatarsien ainsi que le premier orteil sont absents. Ces animaux ont été élevés dans une solution hydro-alcoolique de propionate de testostérone à la concentration de 500 γ/l à partir du quinzième jour après la ponte, alors que les bourgeons des membres postérieurs n'étaient pas encore visibles. A l'exception de ces deux cas particuliers, les résultats que nous avons obtenus à la suite des traitements avec le propionate de testostérone en solution hydro-alcoolique ou bien avec l'acétate de testostérone en solution huileuse sont identiques : la différenciation sexuelle des gonades n'est pas altérée et la substance administrée a exercé une action inhibitrice au niveau des oviductes.

III. — *Pelodytes punctatus.*

Les larves que nous avons traitées avec le propionate de testostérone provenaient de la même ponte que celles des lots Pdy $A_{57}DK_1$ et $A_{57}DK_3$ traitées par le benzoate d'œstradiol ainsi que celles du lot témoin Pdy $A_{57}T$. Cette ponte avait été récoltée le 1er Mars 1957,

l'éclosion avait eu lieu le 6 Mars et la première prise de nourriture le 11 Mars. Le 15 Mars, alors que les larves mesuraient 4 mm de longueur, deux lots ont été mis en traitement dans une solution hydro-alcoolique de propionate de testostérone : l'un à la concentration de 500 γ/l (lot Pdy $A_{57}EK_1$) l'autre à la concentration de 50 γ/l (lot Pdy $A_{57}EK_3$). La mortalité pendant la vie larvaire a été très faible. Les larves se sont métamorphosées entre le 10 Mai et le 18 Juin 1957. Un certain nombre d'animaux de chaque série ont été sacrifiés et disséqués à la métamorphose cependant que les autres ont été mis en élevage. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Pelodytes punctatus* traitées par le propionate de testostérone.

Lot expérimental		Pdy $A_{57}T$	Pdy $A_{57}EK_1$	Pdy $A_{57}EK_3$
Nombre d'animaux mis en traitement		50	50	50
Traitement. Concentration hormonale		Lot témoin	Propionate de testostérone 500 γ/l	Propionate de testostérone 50 γ/l
Age et stade atteint au début du traitement		2 semaines 4 mm	2 semaines 4 mm	2 semaines 4 mm
Durée de la vie larvaire		70 à 102 jours	70 à 106 jours	70 à 109 jours
Durée du traitement			56 à 92 jours	56 à 95 jours
Mortalité pendant l'élevage		0	5	1
Nombre d'animaux fixés au moment de la métamorphose		24	21	27
Répartition des sexes à la métamorphose	♂	14	12	12
	♀	0	0	0
	♀	10	9	15
Nombre d'animaux mis en élevage		26	24	22
Nombre d'animaux autopsiés 2 mois après la métamorphose		7	13	15
Répartition des sexes		3 ♂, 4 ♀	5 ♂, 8 ♀	10 ♂, 5 ♀

Action sur les gonades.

Les individus mâles et femelles sont en nombres sensiblement égaux dans les deux lots traités, ils portent des testicules ou des

ovaires dont l'aspect extérieur ni la structure histologique, tout à fait comparables à ceux des animaux témoins, ne nous ont montré les traces d'une action éventuelle du traitement administré (fig. 21 et 22, Pl. III ; fig. 48 et 49, Pl. VI).

Action sur les caractères sexuels somatiques.

L'hormone mâle a exercé une action virilisante au niveau de certains territoires récepteurs. C'est ainsi que des caractères sexuels somatiques du mâle adulte se sont manifestés dès la métamorphose, tels que la frange située de chaque côté des orteils et qui était très développée tout comme chez le mâle en rut, ou bien la dilatation de la partie terminale des uretères qui évoque les vésicules séminales du mâle adulte. Les figures 68 et 69, planche VII, permettent de comparer la différence de taille des uretères à des niveaux correspondants chez un témoin d'une part et chez un animal traité par l'hormone mâle d'autre part. Enfin, nous avons observé, chez quelques individus seulement, au niveau des avant-bras des plages kératinisées faiblement développées qui rappelaient celles qui existent chez le mâle en rut de cette espèce.

Parmi les animaux mis en élevage, 13 du lot Pdy $A_{57}EK_1$ ont été disséqués et fixés, ils comprenaient 8 femelles et 5 mâles, et 15 du lot Pdy $A_{57}EK_3$ comprenaient 5 femelles et 10 mâles. Tous présentaient, au niveau des mains, la malformation que nous avons décrite. Après la dissection, les oviductes étaient à peine visibles, ils n'étaient développés que dans leur portion antérieure, la plus proche des pavillons, alors que chez les animaux témoins du même âge ils étaient visibles sur la plus grande partie de leur trajet (fig. 27 et 28, Pl. III).

Action tératogène.

L'action du traitement s'est manifestée chez tous les animaux des lots Pdy $A_{57}EK_1$ et Pdy $A_{57}EK_3$ au niveau des membres antérieurs où elle s'est traduite par la coalescence des deux premiers doigts de chaque main qui, par ailleurs, étaient plus courts que les doigts correspondants des animaux témoins (comparer les figures 7 et 8, planche I). L'étude du squelette des mains de témoins et d'animaux traités (fig. 4) nous a permis de constater :

1) que la soudure des doigts s'est effectuée seulement au niveau du revêtement cutané et que les squelettes axiaux des doigts sont bien individualisés,

2) que ces derniers sont nettement plus courts que ceux des témoins et qu'ils ne comportent plus que deux segments au lieu de 3,

3) que tous les os du carpe, à l'exception du second os carpien à la base du deuxième doigt, sont soudés en une masse osseuse unique de forme irrégulière et variable à l'intérieur de laquelle se devinent parfois les surfaces articulaires du carpe normal. Cependant, le pas-

sage de l'artère carpienne à travers le carpe est maintenu en dépit de la coalescence des os du carpe.

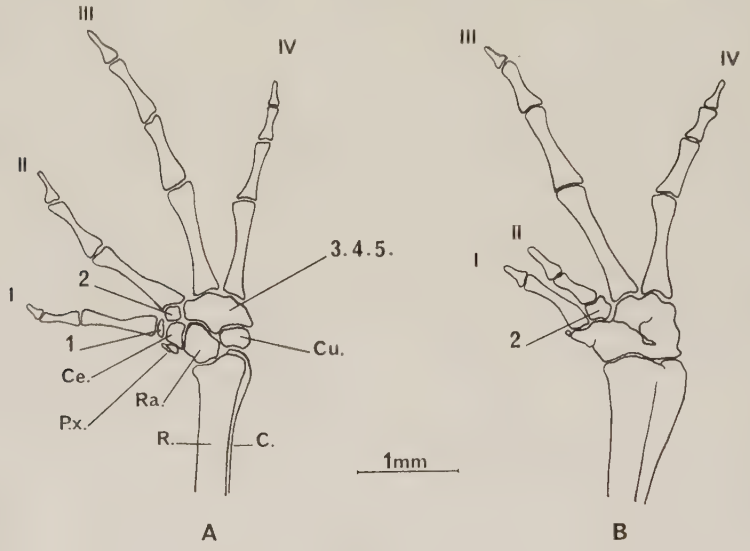

FIGURE 4.

Squelettes de mains droites de *Pelodytes punctatus*, examinés par la face dorsale (dessins à la chambre claire).

A. Animal témoin.

B. Animal du lot Pdy A_{57} EK_1 traité par l'hormone mâle. Observer la réduction des doigts I et II et la fusion presque complète des os du carpe.

I, II, III, IV : premier, second, troisième et quatrième doigts. 1, 2, 3, 4, 5 : premier, second, troisième, quatrième et cinquième os carpiens. C. : cubitus, Ce. : central, Cu. : cubital, P.x. : prépollex, R. : radius, Ra. : radial.

La malformation est apparue d'une manière constante chez tous les animaux des deux lots traités par le propionate de testostérone. Elle s'est maintenue chez les animaux métamorphosés mis en élevage. Nous ne l'avons observée chez aucun animal des autres lots. Elle paraît donc spécifique du traitement par l'hormone mâle et elle se manifeste de la même manière quelle que soit la concentration utilisée. Lorsque le traitement a été instauré, les membres antérieurs étaient à l'état de petits bourgeons coniques longs de 1/10 de millimètre environ.

La syndactylie que nous avons observée est à rapprocher de celle que ROSTAND (1950) a obtenue chez *Rana temporaria* à la suite de l'élevage des têtards dans une solution de trypaflavine à la concentration de 1/200.000 ($= 5.10^{-6}$). Cependant la syndactylie qu'il observait dans ces conditions concernait aussi bien les doigts I et II que les doigts III et IV ou II et III et elle était accompagnée d'autres anomalies telles que la raideur ou la torsion des membres postérieurs ou l'ectrodactylie des membres postérieurs à la suite de la

disparition de l'orteil I ou des orteils I et II ; ce sont là des anomalies variées comparables à celles que nous avons décrites précédemment chez *Pelobates cultripes*. La syndactylie que nous décrivons concerne de façon constante les doigts I et II et d'autre part, elle a été obtenue avec des concentrations de propionate de testostérone de l'ordre de 5.10^{-7} et 5.10^{-8}.

Dans le but de comparer la réaction de deux espèces différentes de Batraciens à l'administration du propionate de testostérone, nous avons introduit dans les cuvettes d'élevage des lots Pdy $A_{57}T$ et Pdy $A_{57}EK_1$ un certain nombre de têtards de *Rana temporaria* issus de parents qui provenaient de la région de Hennezel dans les Vosges, où l'espèce est représentée par une race indifférenciée (Gallien, 1937 et 1938). Le traitement a débuté le 13.V.1957, les têtards mesuraient 14 mm de long et les festons correspondant aux bourgeons des orteils étaient visibles sur les membres postérieurs. Les têtards se sont métamorphosés en moyenne 3 semaines après le début du traitement, à ce moment ils ont été disséqués et fixés. Les 13 animaux introduits dans le lot $A_{57}T$ sont des femelles dont les ovaires sont reconnaissables à leur forme de petit boudin allongé. Les 18 animaux introduits dans le lot $A_{57}EK_1$ sont des mâles reconnaissables à leurs testicules très courts en forme de carotte.

L'étude des coupes histologiques des gonades de ces deux types a confirmé ces résultats. Les têtards de *Rana temporaria* que nous avons utilisés appartenaient à une race indifférenciée et le traitement avec le propionate de testostérone a provoqué la masculinisation complète de tous les animaux. Au contraire, le même traitement reste sans effet sur la morphogenèse des gonades de *Pelodytes punctatus*. Il agit cependant sur la morphogenèse précoce de quelques caractères sexuels somatiques, sur la morphogenèse du squelette des membres antérieurs et sur celle des oviductes qu'il inhibe partiellement.

L'expérience que nous venons de rapporter met nettement en évidence la différence de réactivité de deux espèces de Batraciens Anoures à l'action d'un traitement effectué avec le propionate de testostérone et elle permet d'autre part d'éliminer l'hypothèse selon laquelle l'absence de réaction que nous avons constatée dans nos expériences au niveau de la gonadogenèse pourrait être due à une différence entre la substance que nous avons utilisée et celles qu'ont employées les expérimentateurs qui nous ont précédé.

IV. — *Salamandra salamandra.*

Nous avons réalisé une expérience avec des larves qui ont été pondues au laboratoire les 24 et 25 Avril 1962. 15 larves ont été élevées dans une solution hydro-alcoolique de propionate de testostérone à la concentration de 500 γ/l (lot SA $B_{62}EK_1$) et 9 larves ont été élevées sans traitement, elles ont servi de témoins (lot SA $B_{62}T$).

La métamorphose, dans le lot témoin, de 8 animaux (l'un est mort au cours de l'expérience) s'est effectuée entre les 18 et 25 Juin 1962, alors qu'elle est survenue plus tardivement et qu'elle s'est étalée sur une période de 4 semaines du 25 Juin au 20 Juillet chez les animaux traités.

Les 8 témoins comprenaient 4 mâles et 4 femelles. Leurs oviductes étaient différenciés et visibles jusqu'au tiers postérieur environ de l'espace dianéphrétique. Parmi les 15 animaux du lot SA $B_{62}EK_1$, il y avait 7 mâles et 8 femelles. Le mésonéphros avait un aspect normal, nous n'avons d'ailleurs pas observé d'ascite chez les larves au cours du traitement. Les canaux de Wolff étaient visibles de chaque côté du mésonéphros et plus larges que ceux des animaux témoins. Les pavillons des oviductes seuls étaient différenciés et ils étaient fortement développés, aussi bien par rapport à ceux des témoins que par rapport à ceux des animaux traités par le benzoate d'œstradiol. Enfin, les lèvres du cloaque normalement aplaties chez les témoins étaient gonflées et proéminentes chez les animaux traités et la papille cloacale était visible au niveau de la commissure antérieure du cloaque.

Le propionate de testostérone est resté sans action sur la différenciation des gonades mais nous devons souligner que le traitement a été instauré à la naissance alors que la différenciation sexuelle s'achevait comme nous l'avons constaté chez deux animaux de cette ponte fixés le 24.IV.1962. Ainsi que nous l'avons précisé au sujet du traitement par le benzoate d'œstradiol, il est nécessaire de traiter les larves très précocement, bien avant le moment où elles sont mises au monde par la mère.

V. — *Triturus alpestris.*

Trois lots ont été traités par le propionate de testostérone selon des concentrations variables (Tableau IX).

Dans le lot TA B_{57} EK_2, le traitement hormonal a exercé une action pathogène particulièrement nette, les animaux ont présenté de l'ascite, caractérisée par un gonflement très intense de la cavité abdominale. A plusieurs reprises, nous avons dû effectuer des ponctions de la cavité abdominale chez les animaux malades afin qu'ils puissent de nouveau nager et s'alimenter, la plupart d'entre eux ont pu, ainsi, atteindre le stade de la métamorphose.

Dans le lot TA C_{57} EK_1, un seul animal a présenté de l'ascite et a été ponctionné. Aucun animal du lot TA D_{57} EK_3 n'a été atteint.

Dans les trois lots, les résultats observés au moment de la métamorphose sont comparables.

Action sur les gonades.

La reconnaissance macroscopique du sexe des gonades est difficile. Dans chaque lot, nous avons reconnu un certain nombre de femelles dont les bandelettes ovariennes étaient épaisses, débordant

TABLEAU IX. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Triturus alpestris* traitées par le propionate de testostérone.

Lot expérimental		TA $C_{57}EK_1$	TA $B_{57}EK_2$	TA $D_{57}EK_3$	TA $D_{57}T$
Nombre d'animaux mis en traitement		26	50	45	45
Traitement. Concentration hormonale		Propionate de testostérone 500 γ/l	Propionate de testostérone 100 γ/l	Propionate de testostérone 50 γ/l	lot témoin
Début du traitement âge, stade		30-35 jours stade 43	30-40 jours stade 42	25-30 jours stade 42-43	25-30 jours stade 42-43
Durée du traitement		70 jours	80 jours	65 jours	—
Durée moyenne de le vie larvaire		105 jours	110 à 120 jours	90 à 95 jours	75 à 80 jours
Mortalité pendant l'élevage		3	19 (ascites)	14	8
Nombre d'animaux fixés à la métamorphose		23	31	31	37
Répartition des sexes à la métamorphose	♀	11	10	12	21
	gonades vestigiales	12	20	19	0
	♂	0	0	0	16
Sexe non identifiable		0	1	0	0

latéralement les corps adipeux et possédant une surface mamelonnée par la présence des auxocytes. En revanche, chez les autres animaux les gonades n'étaient pas identifiables, elles se présentaient comme des bandelettes très minces recouvertes par les corps adipeux et réduites à l'état de filaments, nous les avons considérées comme des gonades vestigiales. Etant donné le nombre d'animaux qui portaient des gonades de ce type nous sommes amenés à penser que la plupart d'entre eux correspondaient à des mâles génétiques.

L'étude histologique des gonades nous a permis de confirmer l'existence, d'une part, d'ovaires normaux porteurs d'une cavité ovarienne typique et constitués d'auxocytes et, d'autre part, de gonades dont le développement a été considérablement inhibé à tel point qu'il est impossible de se prononcer avec certitude sur la nature du sexe de telles glandes. Sur les coupes transversales, la gonade se présente comme un petit lobe rattaché au corps adipeux par un pédicule. Ce lobe est constitué d'un réseau de travées conjonctives plus ou moins lâches où sont dispersés des noyaux cellulaires et,

de place en place, au cours de la succession des coupes histologiques, nous avons observé la présence de gonocytes à noyau lobé, isolés ou par groupes de 3 ou 4 à l'intérieur de ce massif cellulaire. Etant donnée la réduction importante du volume de la gonade, il est difficile de préciser si ces gonocytes ont une localisation corticale ou médullaire.

Action sur les caractères sexuels somatiques.

Tous les animaux présentent une hypertrophie du cloaque dont les lèvres sont gonflées et saillantes alors que chez les témoins, elles sont aplaties (fig. 16, 17, 18 et 19, Pl. II). La dissection des animaux nous a permis de constater l'inhibition partielle ou totale de la différenciation des canaux de Müller alors qu'ils sont différenciés et bien visibles chez les témoins (fig. 15, Pl. II). Dans le cas d'une inhibition totale seuls les ostiums sont visibles à la partie antérieure de la cavité générale, ils sont plus larges que chez les animaux témoins et apparaissent comme deux culs-de-sac blanchâtres (fig. 17 et 19, Pl. II), lorsque l'inhibition n'a été que partielle, les oviductes sont visibles jusqu'au milieu environ de l'espace dianéphrétique et ils sont également plus larges que chez les témoins (fig. 16 et 18, Pl. II). L'intensité de l'inhibition de la différenciation des oviductes est variable selon les concentrations de propionate de testostérone utilisées. Dans le lot TA C_{57} EK_1 (concentration 500 γ/l) 22 animaux sur 23 portent seulement des ostiums dilatés qui sont même parfois fortement plissés et lobés ; chez un seul animal, outre les ostiums, une partie de l'oviducte droit est différenciée. Dans le lot TA B_{57} EK_2 (concentration 100 γ/l) 23 portent seulement des ostiums et 8 portent des oviductes partiellement différenciés, enfin dans le lot TA D_{57} EK_3 (concentration 50 γ/l) les ostiums seuls sont visibles chez 12 animaux et 19 animaux portent des oviductes. Nous avons observé, en outre, que les oviductes étaient généralement accompagnés tout le long de leur bord interne par un canal de coloration blanchâtre qui est visible depuis le niveau des pavillons des oviductes jusqu'au mésonéphros. Cet élément correspond à l'uretère primaire qui, chez les témoins, à ce stade, est presque totalement involué jusqu'à la région antérieure de mésonéphros. D'autre part chez les animaux traités, sur tout son trajet jusqu'au cloaque, le canal de Wolff est plus large que chez les témoins (fig. 15, 16, 17 et 18, Pl. II).

L'étude histologique de l'appareil urogénital nous a permis d'autre part de constater le développement important manifesté par les oviductes et les uretères, particulièrement au niveau de l'espace dianéphrétique, sous l'action du traitement par le propionate de testostérone (fig. 63, Pl. VII). L'hypertrophie de l'oviducte est comparable à celle observée à la suite d'un traitement par le benzoate d'œstradiol (fig. 62, Pl. VII). Les uretères sont hypertrophiés sur la totalité de leur trajet jusqu'au cloaque.

L'étude des coupes histologiques montre que l'hypertrophie du cloaque observée chez les animaux traités est due pour une grande partie au développement précoce important des glandes cloacales. Au moment de la métamorphose, chez les témoins aussi bien mâles que femelles, un petit nombre, de l'ordre d'une dizaine, de glandes abdominales et de glandes pelviennes en cours de différenciation sont visibles (nos observations chez *Triturus alpestris* sont en accord avec celles rapportées par de Beaumont (1933 a) chez *T. cristatus*). Chez l'animal traité par le propionate de testostérone ces glandes sont beaucoup plus nombreuses et elles sont en outre accompagnées par des glandes des lèvres cloacales visibles jusque sur la papille cloacale.

Action tératogène.

Chez quelques individus appartenant au lot TA B_{57} EK_2, le mésonéphros présente des altérations visibles macroscopiquement. Il porte des boursouflures ou bien il est interrompu çà et là sur une courte distance de façon non symétrique d'un côté et de l'autre de l'animal. Au niveau de ces interruptions, on distingue la coloration sombre des mélanophores présents sur la face ventrale des muscles dorsaux et qui sont normalement masqués par les tissus mésonéphrétiques. L'individu B_{57} $EK_2/5$ est particulièrement intéressant à cet égard (fig. 19, Pl. II). De petite taille par rapport aux autres animaux du même lot, il a été sacrifié alors qu'il avait présenté de l'ascite et avait été ponctionné fréquemment. Au moment de la dissection, nous avons noté la minceur de la paroi abdominale et observé la présence de nombreuses lacunes au niveau du mésonéphros, celles-ci sont particulièrement nettes dans la région antérieure correspondant au rein génital, à tel point que le rein semble métamérisé à ce niveau. Les gonades et les corps adipeux sont représentés par des éléments vestigiaux filiformes. Le rein pelvien qui normalement fait suite au rein génital en arrière des gonades est absent et les deux uretères se dirigent vers le cloaque tout en se rapprochant progressivement du plan médian de l'animal. Chez d'autres animaux également nous avons relevé l'absence du mésonéphros dans la région située en arrière des gonades.

Les lésions rénales se traduisent sur les coupes histologiques par une dilatation des tubules mésonéphrétiques et, parfois, chez les animaux du lot B_{57} EK_2 par l'absence complète, au niveau de certaines coupes, des formations mésonéphrétiques d'un côté de l'animal ou des deux côtés à la fois ; les coupes suivantes intéressent quelques tubules dont la lumière est dilatée et qui forment un petit nodule rénal se terminant bientôt. Chez l'animal B_{57} $EK_2/5$ représenté sur la figure 19, planche II, le mésonéphros ne s'est pas différencié en arrière des gonades.

En conclusion, nous constatons que l'hormone mâle chez *T. alpestris* exerce d'une part une action inhibitrice sur la différenciation

des gonades mâles, du mésonéphros et des oviductes, d'autre part une action stimulante qui se manifeste par une hypertrophie du cloaque, des uretères et des portions des oviductes qui se sont différenciées malgré l'action inhibitrice. L'action inhibitrice, au niveau des gonades, s'exerce principalement sur la médulla ; elle empêche ainsi la différenciation des testicules alors que s'effectue la différenciation des ovaires dans lesquels normalement la médulla régresse.

VI. — *Triturus helveticus.*

Les lots suivants d'animaux ont été traités par le propionate de testostérone :

TH A_{57} EK_1 : 40 animaux mis en traitement (500 γ/l), le 22.I.1957 au stade 42/43. Ascite dès la première semaine du traitement hormonal, arrêt du traitement le 23.II., ponctions des ascites jusqu'au 11.III.
15 animaux fixés entre le 16.II. et le 15.III., non métamorphosés.

TH B_{57} EK_3 : 50 animaux mis en traitement (50 γ/l), le 2.II.1957 au stade 42/43. Ascite à la fin de la première semaine du traitement hormonal, arrêt du traitement le 23.II., ponctions des ascites jusqu'au 11.III.
29 animaux fixés entre le 23.II. et le 15.III., non métamorphosés.

TH C_{57} EK_3 : 50 animaux mis en traitement (50 γ/l), le 7.III.1957 au stade 42, puis 25 γ/l à partir du 19.III.1957.
Ascite à la fin de la première semaine, ponctions des ascites jusqu'au 22.IV.
20 animaux fixés du 15.IV. au 24.IV., non métamorphosés.

TH A_{60} EK_4 : 50 animaux mis en traitement (25 γ/l) le 10.II.1960 au stade 42. Apparition de l'ascite dès la première semaine du traitement, ponctions des ascites jusqu'au 26.III.
26 animaux fixés les 18.III. et 29.III., non métamorphosés.

TH B_{60} EK_5 : 50 animaux mis en traitement (15 γ/l) le 15.III.1960 au stade 42. Apparition de l'ascite, 3 semaines environ après le début du traitement. Arrêt du traitement le 27.IV.1960, ponctions des ascites jusqu'au 6.VI.
35 animaux fixés du 5.V. au 18.VI. dont 8 métamorphosés.

TH H_{60} EK_7 : 30 animaux mis en traitement (10 γ/l) le 5.V.1960 au stade 48/49). Apparition de l'ascite une dizaine de jours après le début du traitement. Ponctions des ascites jusqu'au 26.V. Arrêt du traitement le 28.V.
25 animaux fixés les 24.V. et 28.V.

Action sur les gonades.

Quelle que soit la concentration administrée (depuis 500 γ/l jusqu'à 10 γ/l), les animaux ont manifesté une ascite intense. Dans certains cas, le traitement hormonal a été suspendu, mais cette interruption n'a pas empêché la persistance de l'ascite. Malgré des ponc-

tions fréquentes de la cavité abdominale, la mortalité a été très importante et un très petit nombre d'animaux ont pu achever la métamorphose, la plupart ont été fixés avant ce stade. Dans ces conditions, il nous a été impossible de déterminer la *sex-ratio*.

Le sexe de quelques animaux est reconnaissable, ils sont porteurs de bandelettes ovariennes semblables à celles des femelles témoins, chez d'autres, le sexe est indiscernable car les gonades sont réduites à l'état de très fins filaments d'aspect vestigial.

La structure des gonades chez des animaux métamorphosés du lot TH B_{60} EK_5 montre que la différenciation des gonades mâles est considérablement inhibée, elles présentent une structure vestigiale analogue à celle observée chez *T. alpestris*. Alors que chez cette dernière espèce, la différenciation des gonades femelles était sensiblement normale, chez *T. helveticus* l'inhibition du développement des ovaires est nette. Chez l'animal TH B_{60} $EK_5/2$ (fig. 72, Pl. VIII) par exemple, la cavité ovarienne est bien visible tout le long des gonades mais le cortex ovarien est très mince, il contient un petit nombre d'auxocytes et de nids d'ovogonies, à certains emplacements il est même tout à fait stérile ; ces bandelettes ovariennes mesurent 90 µ environ de large alors que la largeur des ovaires chez les témoins est comprise entre 250 et 350 µ.

Action tératogène.

Chez quelques animaux métamorphosés appartenant au lot TH B_{60} EK_5 nous avons pu observer macroscopiquement des lésions au niveau du mésonéphros. Celui-ci présente de place en place des boursouflures ou bien il est absent en arrière des gonades.

L'étude histologique des animaux, métamorphosés ou non, nous a amené à constater l'existence de lésions importantes au niveau du mésonéphros dont la différenciation est inhibée tant au niveau du rein génital que du rein pelvien. Ces lésions sont de même nature que celles que nous avions observées chez *T. alpestris* à la suite des traitements avec le propionate de testostérone.

Les tubules mésonéphrétiques sont dilatés par rapport à ceux des animaux témoins, et, d'autre part, les lèvres des néphrostomes sont éversées à la surface des éléments du mésonéphros qui se sont différenciés. Les coupes histologiques révèlent l'absence complète du mésonéphros à de nombreux niveaux successifs, d'un côté ou des deux côtés de l'animal. Dans ce dernier cas, les images sont identiques à celles que l'on observe au niveau de l'espace dianéphrétique, à la présence des crêtes génitales près. Chez les animaux fixés avant la métamorphose, les nodules mésonéphrétiques situés en arrière des gonades ont une différenciation très en retard par rapport à ceux des animaux témoins de même stade. Elle est même nulle parfois, ce qui explique l'absence complète du rein pelvien chez certains animaux métamorphosés. De même, la différenciation sexuelle des larves est retardée. Par exemple, chez les animaux du lot TH H_{60} EK_7 sacrifiés le 28.V.1960, soit 23 jours après le début du traite-

ment hormonal, les gonades sont au stade de la crête génitale pédiculisée sans aucune trace des cordons médullaires ou l'amorce de cavités ovariennes alors que chez des animaux témoins de la même ponte la différenciation sexuelle est réalisée. Cependant tous ces animaux mis en traitement au stade 48/49, peu avant le début de l'apparition des cordons médullaires, ont atteint les stades 54 ou 55 a.

En conclusion, les traitements réalisés chez *T. helveticus* avec le propionate de testostérone mettent tout particulièrement en évidence la toxicité de cette substance chez cette espèce où elle a entraîné l'apparition d'ascite à toutes les concentrations employées. L'ascite a persisté même après la cessation du traitement ce qui s'explique par le fait que la différenciation du mésonéphros a été perturbée ; le mésonéphros peut manquer totalement à certains niveaux du rein génital et du rein pelvien. *Triturus helveticus* apparaît plus sensible que *T. alpestris* à l'action de l'hormone mâle puisque la différenciation des gonades mâles et femelles est perturbée, la plupart d'entre elles ont un aspect vestigial au moment de la métamorphose.

C. — CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE.

De l'ensemble des résultats obtenus, se dégagent les faits suivants :

— L'action des hormones sexuelles stéroïdes (propionate de testostérone ou benzoate d'œstradiol) administrées pendant la vie larvaire, se manifeste à différents niveaux de l'organogenèse ; c'est ainsi que les traitements peuvent modifier la structure des gonades, l'aspect des caractères sexuels somatiques ou bien la différenciation d'organes qui n'interviennent pas nécessairement dans les fonctions de reproduction.

— Selon l'espèce qui est éprouvée, l'action des hormones stéroïdes est variable.

Action sur les gonades.

Nous allons considérer, ici, la variabilité de la réaction des espèces aux traitements hormonaux. La manière dont les hormones interviennent dans le déroulement de l'organogenèse des gonades sera abordée au cours de la discussion générale.

Le propionate de testostérone n'a exercé aucune action sur la différenciation des gonades chez *Bombina, Pelobates, Pelodytes* et *Salamandra ;* en revanche, chez *Triturus alpestris* et *T. helveticus,* l'organogenèse des gonades a été inhibée. L'inhibition doit être mise en relation avec l'action inhibitrice observée au niveau du mésonéphros et qui s'est traduite par de l'ascite. La même action a déjà été observée et analysée chez d'autres Urodèles. Chez *Pleurodeles*

waltlii, Gallien (1950 c, 1954 b) a montré que les gonades inhibées évoluent ultérieurement en ovaires. Ainsi, le propionate de testostérone exerce un effet paradoxal, mais la féminisation obtenue est la conséquence de l'inhibition intense subie par les tissus médullaires des gonades indifférenciées dont le cortex évolue lentement en un ovaire. Des faits du même ordre ont été observés chez *Ambystoma maculatum*, *A. tigrinum* et *A. opacum* (Foote, 1940, 1941), chez *A. mexicanum* (Mintz, 1947), *Hynobius nebulosus* (Asayama et Amanuma, 1957) et *Triturus pyrrhogaster* (Asayama et Matsuzaki, 1958). En outre, chez *Ambystoma opacum* et *A. tigrinum*, Bruner et Witschi (1954) ont démontré que les faibles concentrations de l'hormone androgène ne sont pas masculinisantes, contrairement aux conclusions que Pisanò (1951) avait formulées à la suite de ses propres expériences chez *Triturus cristatus*. Ces deux auteurs ont observé que l'hormone mâle administrée, la méthyl-testostérone, exerce une action destructrice sur les gonocytes et que sous son action la médulla se différencie très précocement en canalicules efférents, en tubules urinaires ou bien en capsules glomérulaires. Ces dernières observations confirment l'origine commune du mésonéphros et des tissus médullaires de la gonade et elles démontrent la pluripotentialité du blastème mésonéphrétique qui avait déjà été observée chez *Rana temporaria* (Witschi, 1951 a ; Segal, 1953 ; Witschi, Bruner et Segal, 1953 ; Chang et Witschi, 1955 a). Nous rappellerons que dans nos expériences, la destruction des gonocytes par le propionate de testostérone a été particulièrement évidente chez *Triturus helveticus*.

Le benzoate d'œstradiol n'a exercé aucune action sur la différenciation des gonades chez *Bombina*, cependant que nous avons obtenu la féminisation complète des gonades des mâles génétiques chez *Pelobates* et *Triturus helveticus* et leur féminisation partielle chez *T. alpestris*, *Pelodytes* et *Salamandra* ; nous n'avons pas observé de différences parmi les résultats obtenus avec les concentrations de 500 γ/l ou de 50 γ/l. Ce fait est particulièrement net en ce qui concerne la féminisation partielle réalisée chez *Pelodytes*.

De l'ensemble de nos observations et de celles des autres auteurs (Tableau X), il ressort que la réaction aux traitements hormonaux, au niveau des gonades, est variable selon les espèces.

Chez les Anoures, les types de réaction se divisent en deux groupes et l'importance des facteurs taxinomiques est nettement confirmée. Dans le premier groupe qui rassemble les *Ranidae* et les *Hylidae* (Anoures supérieurs), l'hormone mâle masculinise les femelles génétiques et l'hormone femelle, à faible concentration, féminise temporairement les mâles génétiques alors qu'elle masculinise paradoxalement, à forte concentration, les femelles génétiques. Dans le second groupe, qui rassemble les autres familles, le type de réaction est voisin de celui des *Pipidae* (Anoures inférieurs) présenté par *Xenopus laevis*. Chez cette espèce, l'hormone mâle exerce une action subpathogène au niveau des tissus d'origine

TABLEAU X. — Tableau récapitulatif de l'action des stéroïdes sexuels (testostérone ou méthyl-testostérone et œstrone ou œstradiol) sur l'organogenèse sexuelle des Amphibiens.

(*Abréviations* : C. M., canal de Müller ; C. W., canal de Wolff ; call., callosités ; car. sex. som., caractères sexuels somatiques ; Fém. part., féminisation partielle ; Fém. temp., féminisation temporaire ; Inhib. part., inhibition partielle ; Masc. part., masculinisation partielle ; Masc. perm., masculinisation permanente ; +, action stimulante ; 0 : effet nul).

Espèces	Auteurs	Type génétique	Stéroïdes androgènes		Stéroïdes gynogènes	
			Gonades	Car. sex. som.	Gonades	Car sex. som.
Ranidae :						
R. temporaria	Gallien (1937, 1944).	XY (1)				
R. agilis (= *dalmatina*)	Vannini (1941, 1950 b).				Fém. temp. (doses faibles)	
R. esculenta	Padoa (1936, 1950).					
R. sylvatica	Mintz, Witschi (1946).					
R. pipiens	Witschi, Crown (1937), Foote (1938).		Masc. perm.	+ (C. W., call.)	Masc. (doses fortes)	+ (C. M.)
R. clamitans	Foote, Witschi (1939).					
R. catesbeiana	Puckett (1939, 1940).					
R. japonica	Kawamura, Yokota (1959).	XY (2)				
Hylidae :						
Pseudacris nigrita	Witschi, Foote, Chang (1958).		Masc.		Fém. (doses faibles) Masc. (doses fortes)	
Hyla arborea japonica	Takahashi (1958 a, 1959).		Masc. part.		Fém. part.	
Rhacophorus schlegelii	Iwasawa (1958 a), Amanuma (1963).		Masc. part.		Inhib. testiculaire	
Discoglossidae :						
Bombina variegata			0	+ (call.)	0	0
Alytes obstetricans	Witschi (1951 b).		0		Fém. part.	
Discoglossus pictus	Gallien (1950 a et d).		0	+ (C. W., call.)	Fém. part.	+ (C. M.)

Espèces	Auteurs	Type génétique	Stéroïdes androgènes		Stéroïdes gynogènes	
			Gonades	Car. sex. som.	Gonades	Car. sex. som.
Bufonidae :						
Bufo americanus	Chang (1955).	ZZ (3)	0	+ (gorge)	Fém. part.	
Pelobatidae :						
Pelodytes punctatus	Gallien, Collenot (1958)		0	+ (C. W.)	Fém. part.	+ (C. M.)
Pelobates cultripes	Gallien, Collenot (1958).		0	0	Fém. complète	+ (C. M.)
Pipidae :						
Xenopus laevis	Witschi, Allison (1950), Gallien (1953, 1956).	ZZ (4)	Subpathogène Inhib. part.		Fém. complète	
Salamandridae :						
Pleurodeles waltlii	Gallien (1950 b et c, 1954 b).	ZZ (5)	Pathogène, Fém.		Fém. complète	+ (C. M.)
Ambystoma sp.	Ackart, Leavy (1939).	ZZ (6)	Pathogène			
A. maculatum	Foote (1940, 1941).		Subléthal			
A. tigrinum	Mintz (1947).		Inhibition	+ (C.W., cl.)	Fém. complète	+ (C. M.)
A. opacum	Bruner, Witschi (1954).		différentielle			
A. punctatum	Burns (1938, 1939 a).		Féminisation			
Hynobius sp. :						
H. retardatus	Hanaoka (1939, 1941 a et b).		Inhibition			
H. nebulosus	Asayama, Amanuma (1957).		différentielle,		Fém. complète	
	Asayama, Miyamori (1957 a).		Féminisation			
Triturus sp. :						
T. pyrrhogaster	Asayama, Matsuzaki (1958).		Inhib. diff.,			
T. cristatus	Chieffi (1962).	ZZ (7)	Féminisation		Fém. complète	
T. helveticus	Gallien, Collenot (1960).		Léthal		ou	
T. alpestris	Gallien, Collenot (1960).		Subléthal	+ (C.W., cl.)	partielle	+ (C. M.)
Salamandra salamandra			Non pathogène	+ (C.W., cl.)	Fém. partielle	+ (C. M.)

(1) Witschi (1923) ; (2) Kawamura et Yokota (1959) ; (3) Ponse (1941, 1949) ; (4) Gallien (1955, 1956), Chang et Witschi (1955 b, 1956), Weiler et Ohno (1962) ; (5) Gallien (1954 b) ; (6) Humphrey (1945) ; (7) Callan et Lloyd (1960).

néphrétique et l'hormone femelle féminise les mâles génétiques. Dans ce groupe, entre le type de réaction de *Xenopus* et l'absence de réaction de *Bombina* (*Discoglossidae*) nous rencontrons toutes les étapes de transition représentées par *Pelobates* puis *Pelodytes* chez les *Pelobatidae* et par *Discoglossus* et *Alytes* chez les *Discoglossidae*, cependant que les *Bufonidae* (*Bufo americanus*) présentent un type de réaction proche de celui de *Discoglossus*.

Chez les Urodèles, le type de réaction apparaît sensiblement uniforme d'une espèce à l'autre ; le benzoate d'œstradiol féminise les gonades des mâles génétiques sans présenter d'effet paradoxal aux fortes concentrations, cependant que le propionate de testostérone exerce, au niveau des tissus dérivés du blastème néphrétique, une action inhibitrice ou pathogène plus ou moins prononcée selon les espèces.

Il est intéressant de remarquer que *Xenopus laevis* représente une étape de transition entre les Anoures et les Urodèles.

La variabilité des types de réaction montre l'intérêt méthodologique d'éprouver un grand nombre d'espèces et elle confirme le rôle important que joue la qualité du substrat génétique dans la réaction aux traitements par les hormones sexuelles stéroïdes. D'autre part, nous constatons que quelques-uns parmi nos résultats rappellent des types de réaction qui ont été obtenus dans d'autres classes de Vertébrés :

— Chez *Pelodytes*, les gonades intersexuées rappellent les gonades gauches intersexuées observées chez les Oiseaux après un traitement par le benzoate d'œstradiol.

— Après un traitement par le benzoate d'œstradiol, nous avons observé chez *Salamandra* des gonades mâles dont l'épithélium cortical est épais et qui rappellent les gonades à cortex stérile épais et à structures médullaires involuées, obtenues avec le dipropionate d'œstradiol, dans certaines conditions de chronologie, par Burns (1950, 1956) chez l'Opossum (*Didelphys virginiana*).

— Enfin, l'absence de réaction des gonades chez *Bombina* représente le type de réponse qui est généralement observé parmi les espèces de Mammifères placentaires éprouvées.

Des réactions différentes que l'on aurait pu, en premier lieu, attribuer à des différences qualitatives importantes du substrat génétique ou à des mécanismes différents de l'organogenèse sexuelle normale entre les classes de Vertébrés, se retrouvent en réalité à l'intérieur de la classe des Amphibiens, ou même à l'intérieur d'une famille, pour lesquelles le type de réaction n'est pas homogène.

Action sur les caractères sexuels somatiques.

Les hormones ont généralement exercé sur les caractères sexuels somatiques une action conforme à leur type sexuel. Cette action nous permet de constater que certains territoires sont compétents

dès la métamorphose et confirme que la distinction entre caractères sexuels prépubéraux et post-pubéraux n'est pas justifiée, ainsi que l'a souligné Gallien (1950 e). Il est intéressant de remarquer que la compétence d'un caractère donné apparaît à des moments variables selon les espèces. C'est ainsi que le territoire correspondant à la callosité est compétent dès la métamorphose chez *Discoglossus pictus* et *Bombina variegata* et seulement vers le 100e jour chez *Rana temporaria*. Un phénomène comparable s'observe à propos des canaux de Müller dont le degré de différenciation à la métamorphose est variable selon les espèces ; ils sont différenciés sur presque tout leur trajet chez *Pelobates*, seulement sur une courte portion antérieure chez *Pelodytes* et ils ne sont pas encore différenciés chez *Bombina*.

Le *benzoate d'œstradiol* stimule les canaux de Müller chez *Pelobates* et *Pelodytes* ; chez *Bombina*, il n'accélère pas leur différenciation ; chez les Urodèles, sous réserve d'une action primordiale de caractère inhibiteur, il stimule les ostiums et les canaux de Müller qui se sont différenciés en partie ou en totalité.

Le *propionate de testostérone* provoque le développement de callosités chez *Bombina* et l'apparition de franges aux bords des orteils chez *Pelodytes ;* chez ce dernier, il stimule la région postérieure des canaux de Wolff cependant qu'il exerce une légère action inhibitrice sur le développement des canaux de Müller chez *Pelobates* et *Pelodytes*. L'action inhibitrice du propionate de testostérone sur la différenciation des canaux de Müller chez les Urodèles est nette, mais en revanche, dès lors qu'ils se sont différenciés, ils sont stimulés, ainsi que les ostiums. Chez *Triturus alpestris*, le propionate de testostérone empêche l'involution de l'uretère primaire qu'il stimule dans sa portion dianéphrétique ainsi que dans sa partie mésonéphrétique qui correspond au canal de Wolff. L'action amphisexuelle de la testostérone sur les canaux de Müller a déjà été observée dans d'autres groupes : chez l'Opossum (Burns, 1939 b), les Reptiles (Forbes, 1938 ; Risley, 1941) et les Urodèles (Foote, 1941 ; Mintz, 1947).

La réaction des caractères sexuels somatiques aux hormones mâle ou femelle administrées met en évidence d'une part l'équipotentialité sexuelle du soma qui possède l'équipement génique nécessaire à la réalisation des structures caractéristiques de l'un ou de l'autre sexe et d'autre part l'action morphogène des hormones sexuelles déjà amplement démontrées chez un grand nombre d'espèces de Vertébrés ainsi que chez les Invertébrés (Charniaux-Cotton, 1957, 1964 et Naisse, 1963, 1964).

Nous pensons qu'il convient de rappeler également que Humphrey (1948), chez l'Amblystome, a masculinisé des individus génétiquement femelles, de constitution génétique WW, chez lesquels le sexe phénotypique mâle s'est réalisé en l'absence complète de chromosome Z ; à l'opposé, Yamamoto (1963) a féminisé, chez le Poisson

téléostéen *Oryzias latipes*, des individus génétiquement mâles de constitution YY.

La réaction, parfois très intense, des caractères sexuels somatiques dès la métamorphose souligne que les hormones administrées ont agi au niveau des tissus récepteurs à des doses vraisemblablement extraphysiologiques et qui ne se rencontrent pas normalement chez l'animal à ce stade.

Action sur d'autres organes.

Les traitements hormonaux exercent une action tératogène que nous avons constatée au niveau des membres chez *Pelobates*, avec le benzoate d'œstradiol principalement et chez *Pelodytes*, avec le propionate de testostérone exclusivement.

Chez les Urodèles, ces deux substances inhibent presque complètement la différenciation des canaux de Müller, mais non pas celle des ostiums. Cette inhibition souligne l'emploi de doses extra-physiologiques au moins pour les stades considérés. Gallien (1954 b) chez *Pleurodeles* a déterminé les concentrations liminaires de benzoate d'œstradiol qui entraînent la féminisation des gonades et sont compatibles avec la différenciation des canaux de Müller. Un phénomène analogue d'inhibition a été décrit par Raynaud (1959) chez le fœtus de Souris où le dipropionate d'œstradiol a un effet tératogène vis-à-vis des ébauches mammaires dont la différenciation est altérée ou inhibée.

De plus, chez les Urodèles, vers la fin de la vie larvaire, le benzoate d'œstradiol entraîne l'apparition de lésions au niveau du mésonéphros qui provoquent secondairement la mort des animaux. Le propionate de testostérone s'avère d'emblée toxique à l'égard des tissus du blastème mésonéphrétique, ce qui se traduit par de l'ascite. *Triturus helveticus* est très sensible à l'action du propionate de testostérone, même à la concentration de 10 γ/l, alors que chez *T. alpestris* un seul lot a présenté de l'ascite avec un traitement à la concentration de 100 γ/l, pour les autres concentrations, 500 γ/l et 50 γ/l, les animaux sont restés indemnes.

DEUXIÈME PARTIE.

ANALYSE COMPARATIVE DES EFFETS DU BENZOATE D'ŒSTRADIOL, DU DIÉTHYLSTILBŒSTROL ET DU DIMÉTHYLSTILBŒSTROL.

Nous avons vu dans quelles conditions la féminisation ou la masculinisation des gonades ont pu être obtenues chez certaines espèces d'Amphibiens grâce à l'administration d'hormones stéroïdes pendant la vie larvaire. Nous connaissons l'action du benzoate d'œstradiol ; celle-ci est féminisante chez les Urodèles ainsi que chez certains Anoures (*Xenopus, Discoglossus, Alytes, Pelobates, Bufo. Pelodytes*). Chez les *Ranidae* le benzoate d'œstradiol provoque à faible concentration une féminisation temporaire et à forte concentration la masculinisation de toutes les larves traitées.

Différents auteurs, expérimentant sur d'autres classes de Vertébrés, ont utilisé le benzoate d'œstradiol ainsi qu'une substance œstrogène de synthèse, le diéthylstilbœstrol, dont la structure chimique est différente. Les résultats obtenus avec les deux substances sont identiques chez les Mammifères (Raynaud, 1939), chez les Oiseaux (Wolff, 1939 ; Boss et Witschi, 1947), chez les Reptiles (Vivien et Stefan, 1958) et chez les Poissons téléostéens (Yamamoto, 1953).

En revanche, chez *Rana sylvatica*, Witschi (1948) a étudié l'action du diéthylstilbœstrol et n'a relevé aucun effet de cette substance sur la gonadogenèse même aux doses subtoxiques.

Cette expérience ayant été, à notre connaissance, la seule réalisée avec le diéthylstilbœstrol chez les Amphibiens, il nous a paru intéressant de rechercher si deux substances œstrogènes, l'œstradiol et le diéthylstilbœstrol, dont les structures chimiques sont différentes, possèdent, ou non, des effets morphogénétiques superposables chez les larves d'Amphibiens qui appartiennent à d'autres familles que celle des *Ranidae*.

Pour réaliser nos expériences, nous avons choisi deux espèces chez lesquelles il était prouvé que le benzoate d'œstradiol administré pendant la vie larvaire provoque la féminisation : *Pleurodeles waltlii* et *Pelobates cultripes*.

Par ailleurs, dans le but de mettre en évidence de manière indirecte l'activité de substances œstrogènes au cours de l'organogenèse des gonades chez *Pleurodeles* nous avons étudié l'action d'une substance antiœstrogène de synthèse : le diméthylstilbœstrol.

A. — ACTION COMPARÉE DU BENZOATE D'ŒSTRADIOL, DU DIÉTHYLSTILBŒSTROL ET DU DIMÉTHYLSTILBŒSTROL CHEZ *PLEURODELES WALTLII*.

Les substances ont été administrées en solution hydro-alcoolique. Les larves ont subi les traitements à partir des stades 41 à 43. Les conditions expérimentales et les résultats des expériences sont récapitulés dans les tableaux XI et XII.

TABLEAU XI. — Tableau récapitulatif des traitements par le benzoate d'œstradiol, le diéthylstilbœstrol et le diméthylstilbœstrol chez *Pleurodeles waltlii* (Protocole expérimental).

Lots et nombre de larves	Volume d'eau (litres)	Nature du traitement	Concentration hormonale	Durée de la vie larvaire (jours)	Durée du traitement (jours)
		Ponte I			
lot 1 ; 10	5	Témoin	0	173	0
lot 2 ; 15	5	Benzoate d'œstradiol	600γ/l soit 6.000 U.I/l(1)	162	46
lot 3 ; 15	5	Diéthylstil-bœstrol	1.000 γ/l soit 6.000 U.I/l(1)	187	56
		Ponte II			
lot 4 ; 12	5	Témoin	0	125	0
lot 5 ; 40	10	Benzoate d'œstradiol	100 γ/l soit 1.000 U.I/l	132	62
lot 6 ; 40	10	Diéthylstil-bœstrol	165 γ/l soit 1.000 U.I/l	132	62
		Ponte III			
lot 7 ; 30	10	Témoin	0	160 à 180	0
lot 8 ; 30	10	Diméthyl-stilbœstrol	100 γ/l	160 à 200	140 à 180
		Ponte IV			
lot 9 : 16	5	Témoin	0	128	0
lot 10 ; 31	10	Diméthyl-stilbœstrol	150 γ/l	128	58

(1) Cette concentration a été diminuée de moitié 4 jours après le début du traitement en raison de l'effet toxique du diéthylstilbœstrol.

Action du benzoate d'œstradiol et du diéthylstilbœstrol. Dans le but d'opérer sur un nombre relativement peu élevé d'animaux et, ainsi, d'alléger le protocole expérimental tout en obtenant des résul-

TABLEAU XII. — Tableau récapitulatif des résultats obtenus chez *Pleurodeles waltlii* avec les traitements par le benzoate d'œstradiol, le diéthylstilbœstrol et le diméthylstilbœstrol.

Pontes et lots	Nombre de larves mises en expérience	Morts pendant l'expérience	Nombre d'animaux mis en élevage	Nombre et sexe des animaux autopsiés								
				à la métamorphose			2 mois après la métamorphose			6 mois après la métamorphose		
				♂	♂♀	♀	♂	♂♀	♀	♂	♂♀	♀
Ponte I												
1	10	1	2	7								
2	15	1	4			10						
3	15	9				6						
Ponte II												
4	12	2	2	7			1					
5	40	4	8			24			4			
6	40	22				12			6			
Ponte III												
7	30	5		8		17						
8	30	4			1	25						
Ponte IV												
9	16	1		12			1			2		
10	31	1			5	10	4	3	3	4	1	

tats significatifs, nous avons utilisé les pontes d'une néo-femelle, c'est-à-dire d'un mâle génétique préalablement féminisé dont on sait que la descendance est composée en totalité d'individus génétiquement mâles (Gallien, 1954 b). Deux pontes issues de la même néo-femelle mais de mâles différents ont servi pour les deux expériences.

Les concentrations en poids du benzoate d'œstradiol et du diéthylstilbœstrol ont été calculées de telle sorte que pour les deux substances les concentrations en unités œstrogènes internationales étaient identiques, puisque la similitude des propriétés œstrogènes des deux substances était le point de départ de ces expériences comparatives.

Dans les conditions expérimentales décrites, l'action du benzoate d'œstradiol a été nette ; elle est identique à celle rapportée, chez la même espèce, pour les mêmes concentrations, par Gallien (1954 b) ; elle se traduit :

1) par la féminisation des gonades, celles-ci ont l'aspect de longues bandelettes blanchâtres, alors que les animaux des lots témoins portent des testicules caractérisés par une longueur moindre et un épaississement de leur région postérieure ;

2) par l'inhibition des canaux de Müller, qui sont totalement absents ou bien réduits à leur portion ostiale. Lorsque celle-ci est présente, elle est cependant plus développée que la partie correspondante des oviductes des animaux témoins, différenciés et nettement visibles sur tout leur parcours sous la forme de fins filaments blanchâtres.

La dilatation des parties ostiales est due à l'action œstrogène du benzoate d'œstradiol. Celles-ci se comportent comme des caractères sexuels somatiques dès lors qu'elles ont réussi à se différencier.

Les résultats obtenus dans les lots 3 et 6 traités par le diéthylstilbœstrol sont identiques à ceux observés dans les lots 2 et 5 : les animaux portent tous des ovaires et la différenciation des oviductes est inhibée.

Les animaux des lots 5 et 6 sacrifiés deux mois après la métamorphose présentent tous des ovaires caractéristiques. A ce moment, l'évolution des bandelettes ovariennes a progressé, elles se sont élargies et de nombreux ovocytes blancs donnent à leur surface un aspect mamelonné. Pendant le même temps, chez les témoins, les testicules ont acquis un aspect piriforme par suite du développement de leur partie postérieure.

Le diéthylstilbœstrol a donc le même effet gynogène que le benzoate d'œstradiol lorsqu'il est administré pendant la vie larvaire chez *Pleurodeles waltlii* (Collenot, 1961). Il convient d'y ajouter des effets toxique et narcotique. En effet, la mortalité a été plus forte dans les lots 3 et 6 que dans tous les autres lots et la plupart des animaux sont morts dans les lots 3 et 6 au cours des trois premières semaines des traitements. L'addition de la solution alcoolique de diéthylstilbœstrol à l'eau d'élevage entraînait dans l'heure suivante l'immobilisation des larves qui reposaient inertes sur le fond des cuvettes d'élevage sans réagir aux excitations mécaniques. Ces larves étaient pourtant vivantes, le cœur battait et le sang circulait dans les branchies mais elles ne pouvaient s'alimenter, aussi avons-nous été conduit à interrompre régulièrement le traitement afin de ramener les larves à la vie active. Celles-ci, après un séjour de deux heures environ dans l'eau du robinet, pouvaient se mouvoir à nouveau et capturer des proies. Lorsqu'elles s'étaient copieusement nourries, elles étaient remises dans la solution hydro-alcoolique de diéthylstilbœstrol. Ces interruptions ont été renouvelées régulièrement, ceci explique pourquoi la durée effective du traitement est très inférieure à la durée comprise entre son début et sa cessation complète au moment de la métamorphose. Afin d'obtenir des résultats comparables, les traitements par le benzoate d'œstradiol ont été interrompus pendant les périodes correspondantes.

Enfin, il faut signaler également que les larves des lots 3 et 6 traitées par le diéthylstilbœstrol ont présenté par rapport aux larves des autres lots une coloration plus claire, celle-ci était due au fait que les chromatophores présents sur le corps des larves sont restés

constamment contractés et punctiformes même lorsque celles-ci séjournaient dans l'eau pure. Toutefois, dès la métamorphose, les larves de ces lots ont retrouvé une coloration générale comparable à celle des animaux des autres lots. On peut supposer que l'action du diéthylstilbœstrol sur les chromatophores est indirecte et qu'elle est la conséquence de l'action narcotique exercée sur le système nerveux.

En conclusion, le benzoate d'œstradiol et le diéthylstilbœstrol ont, chez *Pleurodeles waltlii,* la même action féminisante sur la gonadogenèse et la même action inhibitrice sur la différenciation des canaux de Müller.

Action du diméthylstilbœstrol. Le diméthylstilbœstrol est une substance de synthèse dont la structure chimique est très voisine de celle du diéthylstilbœstrol, deux radicaux méthyle occupent l'emplacement des deux radicaux éthyle. Le diméthylstilbœstrol possède une activité antiœstrogène qu'il partage avec un assez grand nombre d'autres substances (Emmens et Cox, 1958 ; Emmens, Cox et Martin, 1961 ; Dorfman, 1963). Il se révèle actif à la fois contre les œstrogènes naturels et contre les œstrogènes synthétiques. Chez la souris castrée, en application intravaginale, le diméthylstilbœstrol s'oppose à l'action kératinisante de l'œstradiol, de l'œstrone ou du diéthylstilbœstrol. Mais il est nécessaire qu'il soit appliqué localement, et en même temps que l'une ou l'autre de ces substances, pour qu'il manifeste son pouvoir antiœstrogène. D'autre part, Emmens, Cox et Martin (1962 et 1964) signalent que le diméthylstilbœstrol, ainsi que d'autres substances qui possèdent une activité antiœstrogène, peuvent cependant être des proœstrogènes. Malgré l'ignorance dans laquelle nous sommes actuellement quant aux conditions d'utilisation par les larves des hormones administrées en solution hydroalcoolique, il nous a paru intéressant d'éprouver cette substance voisine du diéthylstilbœstrol.

Dans une première expérience, nous avons traité des larves issues d'une femelle standard croisée avec un mâle standard ; cette ponte (Ponte III) comprenait à la fois des individus mâles et femelles. Dans l'hypothèse, d'une part de l'intervention de substances œstrogènes d'origine interne au cours des processus normaux de la différenciation sexuelle femelle et d'autre part d'une activité antiœstrogène du diméthylstilbœstrol dans les conditions expérimentales réalisées, nous pouvions espérer observer dans le lot traité, à la métamorphose, un déficit d'individus de sexe femelle, la différenciation femelle ayant été inhibée.

Dans une seconde expérience, nous avons traité des larves issues d'une ponte (Ponte IV) provenant de la même néo-femelle que les pontes I et II et nous avons utilisé une concentration molaire de diméthylstilbœstrol identique à la concentration molaire du diéthylstilbœstrol réalisée dans le lot 6 des expériences décrites plus haut. De plus nous avons aménagé des interruptions et des reprises régu-

lières dans l'administration du traitement hormonal si bien que ce dernier est comparable en durée à ceux réalisés avec la ponte II. Dans les deux expériences la durée de la vie larvaire a été sensiblement la même.

Les résultats obtenus avec la ponte III indiquent que l'administration de diméthylstilbœstrol pendant la vie larvaire conduit à la féminisation des gonades des animaux traités. Parmi 26 animaux survivants à la métamorphose qui ont été disséqués, 25 portaient des bandelettes ovariennes typiques, un seul était intersexué, il présentait sur le côté droit une étroite bandelette ovarienne et sur le côté gauche une bandelette élargie à son extrémité postérieure, d'aspect testiculaire. Les animaux témoins de la même ponte, 8 mâles et 17 femelles, présentaient des gonades aisément identifiables.

Les résultats obtenus avec la ponte IV confirment les résultats précédents. Cependant, chez 5 individus considérés comme intersexués, l'une des gonades avait l'aspect d'une bandelette ovarienne alors que l'autre présentait un très léger renflement à son extrémité postérieure.

L'action du diméthylstilbœstrol sur la gonadogenèse est donc féminisante, mais elle est partielle. Ceci est confirmé par les observations suivantes :

Dix animaux autopsiés deux mois après la métamorphose comprenaient :

— 3 femelles portant des bandelettes ovariennes caractéristiques ;
— 3 intersexués dont les gonades avaient l'aspect de bandelettes ovariennes aplaties le long desquelles étaient irrégulièrement disposés un ou plusieurs renflements testiculaires ;
— 4 mâles typiques.

Cinq animaux ont été sacrifiés 6 mois après la métamorphose. L'un était un individu intersexué porteur de bandelettes ovariennes interrompues dans leur partie moyenne par des nodules testiculaires (deux du côté droit, un seul du côté gauche) ; les quatre autres individus étaient des mâles dont deux portaient des testicules piriformes typiques et deux autres portaient des testicules marqués par quelques étranglements transversaux qui étaient sans doute la trace d'une différenciation atypique.

L'action du diméthylstilbœstrol, partielle et temporaire, diffère donc de celles du benzoate d'œstradiol et du diéthylstilbœstrol. Le diméthylstilbœstrol est gynogène ; cependant, à la concentration utilisée (150 γ/l) il a agi comme les concentrations de benzoate d'œstradiol inférieures à 50 γ/l (Gallien, 1954 b). La même conclusion s'impose lorsque l'on envisage l'état des oviductes chez les animaux des lots 8 et 10. Tous les animaux des lots témoins (7 et 9) portaient des oviductes ; parmi les 26 animaux du lot 8, 2 seulement présentaient chacun un seul oviducte, l'un le droit, l'autre le gauche, légèrement dilaté, cependant que chez les autres animaux

seuls les ostiums étaient visibles, à peine dilatés par rapport aux ostiums des animaux témoins. Parmi les 30 animaux du lot 10, 18 portaient 2 oviductes bien différenciés, 2 portaient un oviducte dans sa totalité et l'autre oviducte différencié partiellement sur sa portion antérieure, 5 portaient un seul oviducte et 5 étaient totalement dépourvus d'oviductes. Chez tous ces animaux, les ostiums et les oviductes n'étaient que très faiblement dilatés par rapport à ceux des animaux témoins.

Le diméthylstilbœstrol exerce une action inhibitrice partielle sur la différenciation des canaux de Müller, comparable à l'action des faibles concentrations de benzoate d'œstradiol.

En conclusion, chez *Pleurodeles waltlii*, et dans les conditions de nos expériences le diméthylstilbœstrol a exercé, quoique avec une intensité moindre, la même action féminisante sur la gonadogenèse et la même action inhibitrice sur la différenciation des canaux de Müller que le benzoate d'œstradiol et le diéthylstilbœstrol.

Il est remarquable que deux substances de structure chimique voisine, le diéthylstilbœstrol et le diméthylstilbœstrol, administrées dans les mêmes conditions à des concentrations molaires égales, n'aient pas provoqué la même action pharmacodynamique sur les larves traitées. Seule, la première a présenté une action anesthésique et toxique sur les larves de *Pleurodeles* accompagnée d'une action sur le comportement de leurs chromatophores. La propriété narcotique des hormones stéroïdes et du diéthylstilbœstrol est connue (Gavaudan, 1956) et elle apparaît chez les larves de *Rana sylvatica* lorsque celles-ci subissent un traitement avec des concentrations élevées de certaines hormones stéroïdes telles que l'œstradiol (5000 γ/l), le propionate de testostérone (5000 γ/l) et la progestérone (250 γ/l) (Witschi, 1948). Chez *Rana sylvatica*, le seuil de toxicité indiqué par Witschi (1948) pour le diéthylstilbœstrol correspond à une concentration supérieure à 1250 γ/l. Chez *Pleurodeles waltlii*, ce seuil est sans doute inférieur à 165 γ/l.

B. — ACTION COMPARÉE DU BENZOATE D'ŒSTRADIOL ET DU DIÉTHYLSTILBŒSTROL CHEZ *PELOBATES CULTRIPES*.

Deux lots de têtards provenant d'une ponte récoltée en Mars 1960 ont reçu des injections de solutions huileuses, l'un de benzoate d'œstradiol, l'autre de diéthylstilbœstrol (Tableau XIII). Les larves ont atteint le stade du bourgeon caudal le 8 Mars et se sont alimentées pour la première fois le 16 Mars. Elles ont été élevées dans un grand aquarium situé à l'air libre, hors du laboratoire.

Les 28 et 29 Juin 1960, 125 animaux de même taille, âgés de 4 mois ont été isolés :

— 4 ont été fixés, ils mesuraient 20 mm. L'étude de la différenciation sexuelle a montré que la gonade est indifférenciée à ce stade du développement ;

TABLEAU XIII. — Tableau récapitulatif des lots de larves de *Pelobates cultripes* traitées par le benzoate d'œstradiol et le diéthylstilbœstrol.

Lots		Pba A_{60} T	Pba A_{61} T	Pba B_{60} DK	Pba C_{60} Stilb.
Nature du traitement		Témoin	Témoin	Benzoate d'œstradiol 140 γ/animal soit 1400 U.I./animal	Diéthylstilbœstrol 70 γ/animal soit 1400 U. I./animal
Durée de la vie larvaire		196 à 222 jours	479 à 518 jours	200 jours environ et 500 jours environ	200 jours environ et 500 jours environ
Nombre d'animaux traités		Elevage de nombreux têtards dans un bac à l'extérieur du laboratoire		51	61
Mortalité pendant l'expérience				16	12
Animaux étudiés métamorphosés		12	21	28	41
Animaux étudiés à l'état larvaire				7	8
Répartition des sexes	♂	5	13		6
	⚥			4	11
	♀	7	8	31	32

— 59 ont reçu chacun une injection de 60 γ de benzoate d'œstradiol en solution huileuse (Benzogynoestryl « 5 », de Roussel). Ils constituaient le lot Pba B_{60} DK ;

— 62 ont reçu chacun une injection de 30 γ de diéthylstilbœstrol en solution huileuse (Stilbœstrol Borne). Ils constituaient le lot Pba C_{60} Stilb.

Un mois plus tard, 51 animaux survivants du premier lot ont reçu chacun 125 γ de benzoate d'œstradiol, et 61 animaux survivants du second lot ont reçu chacun 62 γ de diéthylstilbœstrol.

Compte tenu des pertes éventuelles des solutions injectées nous évaluons la quantité totale reçue par chaque animal à 140 γ de benzoate d'œstradiol dans le lot Pba B_{60} DK et 70 γ de diéthylstilbœstrol dans le lot Pba C_{60} Stilb.

Chez *Pelobates*, de même que chez *Pleurodeles*, les quantités administrées des deux substances étaient telles que les animaux ont reçu des doses comparables en unités œstrogènes internationales, soit ici 1400 unités internationales.

Les larves ainsi traitées ont été maintenues en élevage à l'intérieur du laboratoire dans des bacs en ciment alimentés en eau courante. Les animaux témoins fixés au moment de la métamorphose provenaient de la réserve de larves élevées à l'extérieur du laboratoire (cf. *Pelobates*, première partie, page 26).

Résultats. — Les résultats sont rassemblés dans le tableau XIII. Dans les lots témoins il y avait au total 18 mâles et 15 femelles. Dans les lots Pba B_{60} DK et Pba C_{60} Stilb. où la vie larvaire s'est étalée sur deux années, les animaux se sont métamorphosés en 1960 et en 1961, enfin quelques-uns ont été autopsiés à l'état de têtards. Ces animaux portaient des gonades différenciées dont les caractères n'ont pas modifié la nature des résultats. Les résultats numériques du tableau XIII sont donnés pour l'ensemble des animaux autopsiés de chaque lot. Des gouttelettes d'huile ont été retrouvées sous la peau de la gorge chez tous les animaux disséqués. Parmi les 35 animaux du lot Pba B_{60} DK, il y avait 31 femelles et 4 intersexués. Tous les animaux portaient des oviductes hypertrophiés par rapport à ceux des témoins. Ils avaient réagi à l'action de l'hormone injectée d'une manière identique à celle qui a été décrite dans la première partie (cf. page 25).

Parmi les 49 animaux du lot C_{60} Stilb. il y avait 32 femelles, 11 intersexués et 6 mâles. Tous les animaux portaient des oviductes hypertrophiés identiques à ceux du lot précédent, à l'exception de 3 intersexués chez lesquels les oviductes étaient visibles sous la forme de filaments très étroits et blanchâtres.

Les animaux métamorphosés en 1961 étaient dans l'ensemble de plus grande taille que ceux métamorphosés en 1960 et leurs gonades étaient mieux développées, les ovaires étaient plus larges et godronnés et les testicules plus épais et pigmentés. Il est probable que chez les animaux dont la vie larvaire s'est étalée sur deux années, les gonades s'étaient différenciées longtemps avant la métamorphose de telle sorte qu'elles avaient poursuivi leur évolution jusqu'à ce moment, la prolongation de la vie larvaire ayant entraîné une asynchronie entre le développement des gonades et celui du corps.

L'analyse des résultats obtenus dans les deux lots permet de conclure à l'action féminisante des traitements avec le benzoate d'œstradiol et le diéthylstilbœstrol. Cependant dans le lot Pba C_{60} Stilb., nous avons obtenu des mâles en plus des intersexués ; l'action féminisante du diéthylstilbœstrol paraît donc avoir été plus faible que celle du benzoate d'œstradiol.

L'existence d'individus intersexués dans le lot Pba B_{60} DK traité par le benzoate d'œstradiol dont l'action féminisante est complète chez *Pelobates cultripes* est importante à considérer. Les individus intersexués des deux lots seront étudiés en détail dans la quatrième partie. Néanmoins, l'aspect extérieur de leurs gonades permet d'envisager la manière dont elles se sont organisées. Il est remarquable en effet que la plupart des nodules testiculaires que l'on observe

au niveau des bandelettes ovariennes sont situés dans la partie postérieure de celles-ci (fig. 33 et 34, Pl. IV). L'existence de gonades intersexuées biparties suggère une différenciation de ces gonades en deux temps, tout d'abord, une différenciation dans le sens ovarien, chez tous les animaux, quelle que soit la nature de leur sexe génétique, sous l'action de la substance administrée puis, l'année suivante, une différenciation dans le sens ovarien ou testiculaire selon le sexe génétique de l'animal, la substance administrée ayant été totalement ou partiellement éliminée au cours de la longue vie larvaire qui a suivi la seconde injection. Une confirmation de cette interprétation est apportée par les résultats que Witschi et Dale (1962) ont observés chez *Xenopus* avec des traitements gynogènes de courtes durées établis à différents moments au cours de la différenciation sexuelle. Les auteurs ont obtenu des individus intersexués de types variés où les régions qui se sont différenciées dans le sens mâle conformément à la nature du sexe génétique des animaux sont situées aux niveaux antérieurs, moyens ou postérieurs des gonades selon le moment où a été appliqué le traitement.

C. — CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE.

Chez *Pleurodeles*, le diéthylstilbœstrol administré en solution hydro-alcoolique a la même action que le benzoate d'œstradiol sur la différenciation des oviductes qu'il inhibe et sur la différenciation des gonades des mâles génétiques qu'il féminise. Il présente, en outre, des effets toxique et anesthésique sur les larves.

Chez *Pelobates*, le diéthylstilbœstrol injecté en solution huileuse exerce la même action œstrogène que le benzoate d'œstradiol sur les oviductes mais en revanche son action féminisante sur les gonades n'est que partielle. La différence d'action entre les deux substances est-elle d'ordre qualitatif ou quantitatif ? Il est possible que l'élimination du diéthylstilbœstrol, lorsqu'il est administré en solution huileuse, soit plus rapide que celle du benzoate d'œstradiol. Cette éventualité serait masquée chez *Pleurodeles* par le renouvellement régulier de la solution hydro-alcoolique.

Des substances qui ont un pouvoir œstrogène chez les Vertébrés adultes ont montré une action féminisante sur la gonadogenèse de *Pleurodeles* et *Pelobates*. Ces résultats s'intègrent avec ceux obtenus précédemment par d'autres auteurs chez les Mammifères, les Oiseaux, les Reptiles et les Poissons. Cependant, chez *Rana sylvatica*, Witschi (1948) n'a pas obtenu avec le diéthylstilbœstrol l'action féminisante ni l'action masculinisante « paradoxale » obtenues avec l'œstradiol. On peut se demander si les différences dans les réactions à l'une et à l'autre substance ne doivent pas être rapprochées de la réaction particulière aux hormones stéroïdes qui caractérise les espèces appartenant à la famille des *Ranidae*.

Le diméthylstilbœstrol, très voisin par sa structure chimique du diéthylstilbœstrol, agit chez *Pleurodeles* comme une substance gynogène faible, tant sur les gonades que sur les oviductes. Il n'a manifesté aucune toxicité ni aucune action anesthésique sur les larves. Les auteurs qui ont étudié les propriétés antiœstrogènes *in situ* de cette substance chez les Mammifères ont également signalé ses propriétés proœstrogènes.

TROISIÈME PARTIE.

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE Δ^5-3 β-HYDROXYSTÉROÏDE DÉSHYDROGÉNASE DANS LES GONADES DES LARVES DE *PLEURODELES WALTLII*.

Une voie importante de la biosynthèse des hormones stéroïdes chez les Mammifères comporte une oxydation des Δ^5-3 β-hydroxystéroïdes en Δ^4-3-cétostéroïdes (Samuels *et al.*, 1951 ; Rubin, Deane et Hamilton, 1963). La réaction s'effectue grâce à une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase qui dépend du NAD (nicotinamide-adénine dinucléotide) et qui est présente dans les tissus producteurs de stéroïdes (testicule, ovaire, placenta, cortex surrénalien). L'activité de l'enzyme peut être mise en évidence dans ces tissus à l'aide de la technique histochimique mise au point par Wattenberg (1958), puis modifiée par Levy, Deane et Rubin (1959).

Cette technique a été appliquée à différents groupes de Vertébrés et elle a permis de déceler une activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique chez les Sauropsidés dans le tissu interstitiel de Leydig, le tissu corticosurrénalien et le tissu ovarien (Arvy, 1962 et Botte, 1963), chez les Sélaciens dans le tissu interrénal et le tissu testiculaire (Chieffi, Botte et Visca, 1963 ; Collenot G. et Ozon, 1964) et chez les Téléostéens dans le tissu interrénal (Chieffi et Botte, 1963 b).

Chez les Amphibiens Anoures, l'activité enzymatique a été décelée au niveau du tissu interrénal à partir de la troisième semaine chez *Xenopus laevis* (Rapola, 1962), chez les adultes de *Bufo bufo* (Pesonen et Rapola, 1962) et chez les larves et les adultes de *Rana esculenta* (Chieffi et Botte, 1963 a). L'activité enzymatique est absente au niveau des gonades à l'exception, après un traitement par les gonadotrophines, des testicules de *Xenopus laevis* (Pesonen et Rapola, 1962) et de *Rana esculenta* (Chieffi et Botte, 1963 a).

Chez les Amphibiens Urodèles, en revanche, l'activité enzymatique a été décelée dans les testicules d'adultes normaux de *Triturus cristatus carnifex* (Della Corte, Galgano et Cosenza, 1962) ; chez *Pleurodeles waltlii*, une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase a été mise en évidence biochimiquement et histochimiquement dans le tissu interrénal à partir de l'éclosion (Gallien, Certain et Ozon, 1964) et dans les testicules des adultes mature et immature (Certain *et al.*, 1964).

L'activité enzymatique est localisée, dans les testicules matures, principalement au niveau du tissu glandulaire (fig. 97, Pl. X) ; dans les testicules immatures de mâles âgés de 7 mois et demi à 10 mois dont les lèvres du cloaque commencent à devenir saillantes, nous l'avons observée au niveau de petits îlots cellulaires disséminés parmi les cystes testiculaires (fig. 96, Pl. X). Ces petits îlots paraissent ainsi représenter, au moins temporairement, chez *Pleurodeles*, l'équivalent du tissu interstitiel typique observé par exemple dans le testicule des Anoures et des Mammifères.

Quelques-uns parmi les résultats précédents et d'autres, obtenus par Ozon en 1963, montrent que des systèmes enzymatiques susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des hormones stéroïdes apparaissent précocement chez les larves d'Amphibiens. Nous nous sommes demandé si l'activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique mise en évidence notamment dans les testicules immatures de *Pleurodeles waltlii* ne pouvait pas être décelée chez cette espèce à des stades très précoces du développement des gonades. A notre connaissance, chez les Amphibiens, les seules recherches effectuées jusque là sur des gonades pendant les stades larvaires étaient celles de Chieffi et Botte (1963 a), chez *Rana esculenta*, qui avaient abouti à des résultats négatifs.

Mise en évidence de l'enzyme chez les mâles génétiques.

Dans une première étape, nous avons cherché à mettre en évidence l'activité enzymatique chez les mâles génétiques. Dans ce but, nous avons utilisé une ponte (Pl_{17} C_{64} T) issue du croisement d'un mâle standard avec une néo-femelle (mâle génétique préalablement féminisé) dont la descendance est composée uniquement d'individus mâles (Gallien, 1954 b). Nous avons appliqué la technique histochimique de Levy, Deane et Rubin (1959) décrite précédemment.

19 larves ont été étudiées à partir du stade 44. Dès ce stade, l'activité enzymatique existe dans les gonades où nous avons pu déceler le dépôt de petits granules de formazan. Nous l'avons ensuite observée dans les gonades aux stades 45, 48, 50, 52 et 53. Au stade 48, les larves sont à la moitié de la vie larvaire et au stade 53, aux trois-quarts de celle-ci. Les granules de formazan sont localisés dans la partie centrale de la glande, au niveau des cellules des cordons médullaires (fig. 95, Pl. X). Leur présence, discrète dans les premiers stades étudiés, s'est accentuée aux stades 52 et 53 (fig. 92, 93, 95, Pl. X) ; à ce moment, les granules de formazan sont volumineux et ils sont disposés en calottes sur des gouttelettes lipidiques tout comme dans le tissu interrénal et dans les testicules des adultes.

La présence des granules de formazan semble redevenir discrète et même nulle au stade 54 jusqu'à la métamorphose, au stade 55.

Il est intéressant de noter que les stades 43 à 50 correspondent à la mise en place des territoires, cortex et médulla, de la gonade indifférenciée et que la différenciation sexuelle débute, chez le Pleurodèle, au stade 53.

A tous les stades étudiés, nous avons constaté la présence de formazan au niveau du tissu interrénal. En aucun cas, nous n'avons observé de précipité de formazan sur les coupes incubées dans un milieu privé de déhydroépiandrostérone (DHA).

La présence des granules de formazan est délicate à établir lorsque ces derniers sont de petite taille, en raison de la présence simultanée de fines granulations sombres de pigment situées dans le cytoplasme des gonocytes. Cependant, la taille de ces granulations est constante et leur coloration est brun-jaune alors que la taille des granules de formazan est variable et leur coloration est bleu-noir ; enfin, l'étude des coupes témoins incubées pendant la même durée dans un milieu privé de DHA permet de faire assez facilement la différence entre les deux types de granulations.

Action du benzoate d'œstradiol, *in vivo*.

Après avoir observé, dès le stade 44, la présence d'une activité enzymatique au niveau des gonades des mâles génétiques, nous avons traité, à partir du stade 45, une vingtaine de larves de la même ponte (lot PL_{17} C_{64} DK_2) par le benzoate d'œstradiol en solution hydro-alcoolique à la concentration de 200 γ/l. Chez le Pleurodèle, cette concentration est pleinement gynogène (Gallien, 1954 b). Nous avons effectué la recherche histochimique de l'enzyme dans les gonades de 11 animaux aux stades 52, 53 et 54.

Afin d'obtenir des résultats comparables dans les lots C_{64} T et C_{64} DK_2, nous avons associé dans un même bloc, au moment de la congélation, des larves de chaque lot ; les conditions de la recherche histochimique de l'enzyme étaient ainsi rigoureusement identiques. La position des larves de l'un et de l'autre lot dans le bloc était soigneusement repérée.

Nous avons pu ainsi constater chez les 11 animaux du lot DK_2 que nous avons étudiés que les gonades étaient totalement dépourvues de précipité de formazan, alors que celui-ci est présent, de façon constante, chez ces mêmes animaux, au niveau du tissu interrénal (fig. 94, Pl. X). Nous n'avons pas étudié au moment de la métamorphose les gonades des animaux traités car les animaux restants du lot DK_2 sont morts à ce stade ; nous avons pu constater cependant, après la dissection, qu'ils portaient des gonades différenciées en bandelettes ovariennes, alors que tous les témoins étaient mâles à la métamorphose.

Nous avons renouvelé ces observations sur une ponte $PL_{17}243$ issue d'une autre néo-femelle dont les animaux ont été répartis en trois lots :

— le premier lot a été traité par le benzoate d'œstradiol en solution hydro-alcoolique, à la concentration de 200 γ/l.
— le second lot a reçu dans l'eau d'élevage et selon le même rythme une quantité d'alcool absolu équivalente à celle apportée dans le premier lot à l'occasion du traitement hormonal.

— le troisième lot n'a subi aucun traitement particulier et il a constitué le lot témoin.

Dans ces conditions, nous avons constaté l'absence de dépôt de formazan dans les gonades des animaux traités par le benzoate d'œstradiol alors que le formazan est présent dans les gonades des animaux témoins et dans celles des animaux traités par l'alcool absolu. Ainsi, nous pouvons conclure que c'est l'administration de benzoate d'œstradiol qui a entraîné au niveau des gonades l'absence complète de dépôt de formazan, c'est-à-dire l'absence d'une activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique.

Mise en évidence de l'enzyme chez les femelles génétiques.

Ces résultats étant acquis, il était tentant d'une part de relier la présence de l'activité enzymatique dans les gonades embryonnaires chez les mâles génétiques aux processus de la différenciation sexuelle et d'autre part mettre en parallèle l'action du benzoate d'œstradiol sur l'activité enzymatique et l'action gynogène de cette substance sur la différenciation sexuelle des gonades chez le Peurodèle.

Aussi, dans une seconde étape, avons-nous recherché si l'activité enzymatique existe dans les gonades des femelles génétiques au cours de la vie larvaire.

Chez le Pleurodèle, nous ne pouvons pas disposer de pontes constituées uniquement d'individus femelles comme cela est possible chez l'Axolotl (Humphrey, 1945). Nous avons donc utilisé des larves issues de deux pontes standard, dont, théoriquement, une moitié sont des mâles et l'autre moitié des femelles.

Les larves appartenant à deux pontes standard ont été utilisées, 23 larves de la ponte PL 40 ont été étudiées entre les stades 47 et 51 et 17 larves de la ponte PL 200 entre les stades 50 et 53.

Au total, chez les 40 larves étudiées nous avons constaté la présence d'une activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique dans le tissu interrénal et au niveau des gonades, tout à fait comparable à celle que nous avons observée chez les mâles génétiques des lots C_{64} T et 243 T.

A la métamorphose, 16 animaux de la ponte PL 40 comprenaient 6 ♂ et 10 ♀ et 14 animaux de la ponte PL 200 : 8 ♂ et 6 ♀.

Ces résultats ne permettent donc pas de considérer l'activité enzymatique observée au niveau des gonades indifférenciées et en cours de différenciation comme un caractère spécifique des gonades des mâles génétiques.

Action du benzoate d'œstradiol, *in vitro*.

Un autre point est à envisager ; il concerne la suppression de l'activité enzymatique au niveau des gonades chez les animaux qui ont subi un traitement par le benzoate d'œstradiol.

Il a été démontré biochimiquement que la β-hydroxystéroïde déshydrogénase extraite de la bactérie *Pseudomonas testosteroni* est inhibée *in vitro* par certains stéroïdes, dont l'œstradiol 17 β, ainsi que par le diéthylstilbœstrol (Marcus et Talalay, 1955 ; Talalay et Marcus, 1956 ; Ferrari et Arnold, 1961 et 1963 a et b).

Dans le but de vérifier si une inhibition de la même nature a lieu chez *Pleurodeles*, nous avons réalisé l'expérience suivante :

5 animaux témoins, de la ponte PL_{17} 243 déjà citée, au stade 53-54, ont été congelés et débités au cryostat. Les coupes ont été mises à incuber pendant 25 minutes dans différents milieux, elles représentent 5 groupes différents :

groupe 1 : incubation dans le milieu déjà décrit (cf. p. 19) contenant de la déhydroépiandrostérone (DHA) comme substrat ;

groupe 2 : incubation dans le milieu privé de DHA, ces coupes ont servi de contrôle ;

groupe 3 : incubation dans un milieu contenant à la fois de la DHA et de l'œstradiol 17 β ;

groupe 4 : incubation dans un milieu où la DHA est remplacée par l'œstradiol 17 β ;

groupe 5 : après une incubation de 25 minutes dans le même milieu que le groupe 4, incubation pendant la même durée dans un milieu contenant de la DHA.

Nous avons observé les résultats suivants :

— les coupes des groupes 2 et 4 ne contiennent aucune précipité de formazan dans le tissu interrénal ni au niveau des gonades ;

— les coupes des groupes 1 et 3 contiennent des dépôts de formazan dont l'intensité est tout à fait comparable dans le tissu interrénal et dans les gonades respectivement ;

— enfin, dans le groupe 5, l'intensité du dépôt de formazan au niveau du tissu interrénal est comparable à ce qu'elle est dans les groupes 1 et 3 ; en revanche, au niveau des gonades, l'intensité du dépôt de formazan se trouve considérablement diminuée et elle est nulle sur près de la moitié des coupes.

Au total, l'incubation préalable dans un milieu contenant de l'œstradiol 17 β diminue l'activité enzymatique observée dans les gonades.

Il est vraisemblable que l'œstradiol administré en solution hydroalcoolique aux larves de *Pleurodeles* inhibe l'activité enzymatique au niveau de leurs gonades selon un processus identique. Il ne paraît donc pas nécessaire de supposer que l'œstradiol a bloqué la synthèse de l'enzyme dans les gonades.

Il reste toutefois à comprendre pourquoi l'activité enzymatique est inchangée au niveau du tissu interrénal chez les animaux traités,

Conclusions.

Les résultats que nous avons obtenus chez *Pleurodeles* (Collenot, 1964) sont, à notre connaissance, les premiers qui démontrent la présence d'une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase au niveau de gonades non différenciées. Rappelons que la présence d'une activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique a été démontrée au niveau des testicules chez le fœtus de souris âgé de 15 jours (Hitzeman, 1962) et chez le fœtus de cobaye âgé de 31 jours (Price, Ortiz et Deane, 1964), au niveau des ovaires à partir du 8e jour et au niveau des testicules à partir du 10e jour chez l'embryon de poulet (Narbaitz et Kolodny, 1964).

La présence de l'activité enzymatique, dès le stade 44 chez le Pleurodèle, démontre que les gonades possèdent un système enzymatique qui intervient dans la biosynthèse des hormones stéroïdes, mais elle ne signifie pas nécessairement que les gonades sont le siège d'une biosynthèse actuelle. En dépit de cette réserve, les résultats obtenus autorisent la prise en considération de l'intervention éventuelle d'hormones stéroïdes dans les mécanismes de la différenciation sexuelle chez le Pleurodèle.

QUATRIÈME PARTIE.

ÉVOLUTION DES GONADES DES ANIMAUX TRAITÉS PAR LE BENZOATE D'ŒSTRADIOL.

Les buts de notre travail représentaient deux étapes successives : il s'agissait tout d'abord d'étudier l'action de traitements par les hormones mâle et femelle sur la différenciation sexuelle des larves de quelques espèces d'Amphibiens non éprouvées jusqu'alors, puis, les conditions de la réalisation de l'inversion du phénotype sexuel étant acquises pour certaines d'entre elles, d'élever jusqu'à la maturité sexuelle les animaux inversés afin de réaliser des croisements entre animaux de même sexe génétique. Cette dernière étape, qui est l'aboutissement des expériences d'inversion sexuelle, a été réalisée par Gallien (1954 b) chez *Pleurodeles waltlii*, par Gallien (1955-1956) et par Chang et Witschi (1955 b, 1956) chez *Xenopus laevis*, et par Kawamura et Yokota (1959) chez *Rana japonica*. Dès 1944, Gallien avait montré, chez *Rana temporaria*, la possibilité et l'intérêt d'élever les femelles génétiques transformées en mâles de façon permanente par la testostérone.

Chez *Pleurodeles* et *Xenopus*, la descendance unisexuée mâle des mâles génétiques transformés en femelles phénotypiques fonctionnelles a permis de préciser que le sexe mâle, chez ces deux espèces, est le sexe homogamétique. En revanche, chez *Rana japonica*, le sexe homogamétique est le sexe femelle. Ce dernier résultat est en accord avec les conclusions que Witschi (1923) avaient tirées des expériences au cours desquelles il avait réalisé des fécondations artificielles avec des gamètes mâles et femelles d'un individu hermaphrodite de *Rana temporaria*.

Nous avons obtenu la féminisation totale des mâles génétiques chez *Triturus helveticus* et *Pelobates cultripes* alors que la féminisation est partielle chez *Salamandra salamandra*, *Triturus alpestris* et *Pelodytes punctatus*.

Les essais d'élevage après la métamorphose de *Triturus helveticus* et *Pelodytes punctatus* ont échoué ; les animaux ont refusé toute alimentation. Au contraire, l'élevage de *Triturus alpestris* et *Pelobates cultripes* a été possible et les résultats que nous avons obtenus chez ces deux espèces font l'objet de cette partie de notre exposé.

A. — *Pelobates cultripes.*

I. — Etude des gonades des animaux intersexués des lots Pba B_{60}DK et Pba C_{60} STILB.

Dans l'analyse des résultats obtenus chez *Pelobates* (cf. 2e partie), nous avons signalé l'existence, dès la métamorphose, d'individus intersexués. Nous rappelons qu'il s'agit d'animaux dont la vie larvaire s'est étalée sur deux années. Nous allons envisager, à la faveur de l'étude de quelques cas concrets, les principaux types de gonades intersexuées observés chez ces animaux. Pour l'ensemble des 69 animaux métamorphosés des deux lots, nous avons obtenu : 51 ♀, 12 ♀♂, 6 ♂.

L'aspect des gonades des individus de sexe femelle est représenté par les ovaires de l'animal Pba B_{60} DK/4 (fig. 32, Pl. IV) traité par le benzoate d'œstradiol. Cet animal, métamorphosé en 1961, est de plus grande taille que la femelle Pba A_{60} T/1 de la même ponte qui s'est métamorphosée en 1960 (fig. 31, Pl. IV). On peut noter d'autre part que les oviductes sont bien visibles et qu'ils sont plus volumineux que ceux de la femelle témoin.

Parmi les animaux intersexués, 3 ont été choisis dont les gonades ont les aspects les plus fréquemment rencontrés.

L'animal C_{60} Stilb/13 (fig. 33, Pl. IV) est un intersexué bilatéral. Les gonades sont symétriques, chacune est constituée de deux parties : l'une, antérieure, a l'aspect d'une bandelette ovarienne assez étroite, de couleur blanche, alors que l'autre, postérieure, est un nodule de forme ovoïde allongée dont la surface lisse et grisâtre porte quelques mélanophores.

L'étude histologique des coupes sagittales de ces gonades montre que la partie antérieure a la structure d'un ovaire ; la cavité ovarienne est bien visible, le cortex ovarien est constitué dans sa majeure partie d'auxocytes dont le diamètre moyen est de 85 µ et celui de leur noyau de 50 µ. La partie postérieure, de nature testiculaire, est constituée de tubes séminifères où s'observent les différents stades de la spermatogenèse. Il existe dans quelques tubes séminifères des spermatozoïdes groupés en bouquets sur des cellules de Sertoli, mais nous n'avons cependant pas observé de spermatozoïdes libres dans la lumière des tubes séminifères. Nous avons rencontré, par ailleurs, quelques auxocytes disposés isolément parmi les spermatogonies à l'intérieur des tubes séminifères. Ces auxocytes ont en général une taille inférieure à celle des auxocytes de la partie ovarienne, leur diamètre mesure en moyenne 50 µ et celui de leur noyau 25 µ. Chaque gonade est reliée au mésonéphros par des canaux qui s'étagent sur toute sa longueur. Sur le côté droit, ils sont au nombre de 9 dont 5 au niveau de la partie ovarienne, 3 au niveau de la partie testiculaire et 1 au niveau de la limite entre ces deux parties. Ils sont au nombre de 7 sur le côté gauche, dont 4 au niveau

de la partie ovarienne et 3 au niveau de la partie testiculaire. Ces canaux sont issus de la région interne de chaque rein, ils se dirigent postérieurement entre les deux lames du mésogonium vers la gonade. Au niveau de la partie ovarienne, ils se terminent en cul-de-sac dans la cavité de l'ovaire alors que dans la partie testiculaire ils se ramifient, donnant naissance aux canaux du *rete testis* qui se mettent en communication avec la lumière des tubes séminifères. Ils sont facilement reconnaissables, ils ont un diamètre de 40 à 60 µ et sont constitués de cellules hautes à cytoplasme clair qui occupent la totalité ou presque du canal, et dont les noyaux de forme très allongée sont disposés radiairement à la périphérie. Ce sont les futurs canalicules efférents du testicule mature, ils ont pour origine les cordons médullaires qui apparaissent dans la gonade indifférenciée.

Au niveau de la partie intermédiaire, une lame mince de cortex ovarien, correspondant à l'épaisseur de deux ou trois ovocytes, recouvre la région antérieure du nodule testiculaire. A ce niveau, nous avons observé qu'une ramification d'un canal du *rete testis* venait s'appliquer étroitement à la surface d'un auxocyte de la pellicule corticale.

L'animal C_{60} Stilb/14 (fig. 34, Pl. IV) possède des gonades qui rappellent par leur configuration celles de l'animal précédent. Cependant, à la différence de celui-ci, le cortex ovarien descend jusqu'à la partie inférieure de chaque nodule testiculaire qu'il recouvre partiellement et sur lequel il est disposé à la manière d'une crête. Cette disposition est particulièrement nette sur la gonade droite et se traduit sur les coupes histologiques transversales par la présence d'un très gros nodule testiculaire surmonté d'une lame ovarienne (fig. 88, Pl. IX). Sur la gonade gauche, le même aspect se retrouve dans la région antérieure du nodule testiculaire alors qu'au niveau de la partie postérieure le cortex ovarien est appliqué étroitement à la surface du nodule (fig. 89, Pl. IX). Dans la partie centrale du nodule testiculaire, on peut voir un canal du *rete testis* ramifié autour duquel les tubes séminifères sont disposés radiairement. Ceux-ci contiennent tous les stades de la spermatogenèse. Les cloisons de tissu conjonctif qui séparent les tubes séminifères ainsi que la membrane albuginée sont peu développées à ce stade alors qu'elles deviennent épaisses chez le mâle adulte. Du côté droit, la structure du nodule testiculaire est la même. Dans la moitié antérieure des gonades la structure intersexuée disparaît et cède la place à une structure ovarienne typique.

Dans les languettes ovariennes qui coiffent les nodules testiculaires, il convient de souligner la présence d'éléments dont la structure, sur les coupes histologiques, rappelle celle des canaux du *rete testis* et des canalicules efférents ; l'un d'entre eux est visible dans la languette représentée sur la figure 88, planche IX. Leur diamètre est compris entre 40 et 60 µ, leur longueur n'excède jamais 80 µ,

ils sont donc le plus souvent de forme sphérique et d'autre part ils ne sont en relation avec aucune des formations canaliculaires auxquels ils ressemblent. Nous avons observé une dizaine de ces formations, que l'on ne rencontre jamais normalement à l'intérieur des ovaires. Nous pensons qu'il s'agit de formations qui tirent leur origine des cellules de la paroi du sac ovarien. En effet, celles-ci dérivent des éléments médullaires de la gonade indifférenciée dont dérivent également, chez le mâle, les canaux du *rete testis* et les canalicules efférents. Normalement, ces derniers s'édifient, lorsque la différenciation sexuelle de la gonade est achevée, à partir des cellules des cordons médullaires qui sont restées en continuité d'une part les unes avec les autres, d'autre part avec le mésonéphros. Dans ce cas particulier, quelques cellules de la paroi du sac ovarien ont édifié, de place en place, sous l'action inductrice des nodules testiculaires voisins, les structures aveugles de forme subsphérique qui ressemblent aux canaux du *rete testis*.

L'animal C_{60} Stilb/15 (fig. 35, Pl. IV) est un individu intersexué asymétrique. La gonade droite est une bandelette ovarienne typique de coloration blanche alors que la gonade gauche est beaucoup plus mince et plus étroite, de coloration grisâtre, recouverte ici et là de mélanophores. L'étude histologique des coupes transversales de ces gonades nous a montré que, à l'exception d'un très petit nodule testiculaire situé à son extrémité postérieure, la gonade droite est un ovaire, cependant que la gonade gauche possède une structure mixte constituée de 3 nodules testiculaires successifs surmontés d'une courte crête ovarienne. Les nodules sont séparés par deux régions où la gonade a la structure d'un ovaire dont le cortex est peu développé. La cavité ovarienne, à ces niveaux, est occupée par des canaux dont la structure rappelle celle des canaux du *rete testis* avec lesquels ils entrent en communication au niveau des nodules testiculaires. Dans la gonade gauche, nous avons observé que de tels canaux étaient en contact avec des ovocytes et que l'un d'eux s'appliquait étroitement à la surface d'un nid d'ovogonies dont les noyaux étaient en prophase de la méiose. On ne pouvait confondre ces cellules avec des spermatocytes de premier ordre observés dans les régions testiculaires voisines, en effet le diamètre des ovocytes est de 11 µ et celui des spermatocytes de premier ordre de 8 µ.

Chez ce dernier animal la spermatogenèse était moins avancée que chez les deux animaux précédents, nous avons observé de très nombreuses spermatogonies, des spermatocytes de premier ordre aux différents stades de la prophase et quelques rares spermatocytes de second ordre. Nous avons noté la présence de quelques auxocytes isolés dans des tubes séminifères du nodule le plus postérieur de la gonade gauche ; leurs dimensions, comparables à celles des auxocytes qui occupent une situation analogue chez l'animal C_{60} Stilb/13, sont inférieures à celles des auxocytes observés dans l'ovaire situé sur le côté droit.

L'étude de ces animaux permet de dégager deux ordres de phénomènes :

a) nous avons obtenu, à la métamorphose, des animaux intersexués alors que nous n'avons observé rien de tel parmi les témoins de nombreux lots. A l'exception de quelques rares auxocytes situés à l'intérieur des tubes séminifères, les territoires mâles et femelles apparaissent nettement délimités sur les coupes histologiques et ils contiennent chacun des éléments de la lignée germinale qui ont subi les cytodifférenciations des gamètes mâles ou femelles. Les territoires testiculaires sont situés près du hile alors que les territoires ovariens occupent une position apicale et superficielle par rapport aux précédents. La dualité de ces territoires est superposable à la dualité cortico-médullaire que nous avons observée plus précocement au cours de l'organogenèse de la gonade. La gonade intersexuée se présente donc comme si chaque territoire contenant des cellules germinales avait évolué pour son propre compte, indépendamment de la présence de l'autre territoire.

b) toutefois, il faut prendre en considération également la structure antéro-postérieure des gonades intersexuées. Elle permet d'envisager quelles conditions ont prévalu localement au cours de la différenciation de la gonade qui s'est effectuée selon une direction céphalocaudale. Nous pouvons distinguer 3 groupes d'animaux :

Le *premier groupe* comprend trois animaux intersexués (n° 1, 2 et 3) du lot Pba B_{60} DK, métamorphosés en 1961, et deux animaux (n° 16 et 17) du lot Pba C_{60} Stilb. métamorphosés en 1961. Ils portent des gonades dont l'aspect est semblable à celui des gonades de l'animal C_{60} Stilb/14. Ce sont des bandelettes ovariennes godronnées qui portent à leur extrémité postérieure un nodule testiculaire de forme ovoïde. Chez les animaux de ce groupe, l'intersexualité est localisée dans la région postérieure de la gonade, la partie antérieure qui s'est différenciée la première a subi l'action féminisante du benzoate d'œstradiol ou du diéthylstilbœstrol. Plus tard, cette action féminisante s'est sans doute exercée plus faiblement du fait que pendant la longue vie larvaire les substances injectées ont été métabolisées par les larves ; aux niveaux correspondants des gonades en cours de différenciation, l'équilibre cortico-médullaire n'a pas été modifié totalement à l'avantage du territoire cortical. Nous retrouvons là une situation comparable à celle qui existe dans l'ensemble de la gonade au moment de la métamorphose chez *Pelodytes punctatus* après un traitement par le benzoate d'œstradiol. Le territoire médullaire a été colonisé par des cellules germinales et il a édifié un testicule juxtaposé au territoire cortical où s'effectue l'ovogenèse. Toutefois, la taille des auxocytes et le degré d'évolution de la spermatogenèse observés chez ces animaux ne correspondent pas à ceux que nous avons rencontrés chez les animaux qui se sont métamorphosés en 1960 chez lesquels l'ovaire contient seulement quelques auxocytes de faible taille et surtout des nids d'ovogonies en préméiose, cependant

que les testicules ne contiennent que des spermatogonies et les tubes séminifères sont en cours d'organisation. En dépit de la prolongation de la vie larvaire, les gonades, après s'être différenciées, ont poursuivi leur évolution, si bien que nous observons des spermatozoïdes dans les gonades d'animaux qui achèvent leur métamorphose.

Parmi les animaux du premier groupe, une mention particulière doit être réservée pour l'animal C_{60} Stilb/13 (fig. 33, Pl. IV) dont les nodules testiculaires ne sont recouverts par une mince couche cellulaire de nature ovarienne que dans leur partie la plus antérieure. Il est fort probable que l'action du diéthylstilbœstrol a été trop faible pour empêcher la prévalence du territoire médullaire au moment où les parties postérieures des gonades se sont différenciées. A ce niveau un testicule s'est organisé et non pas une gonade intersexuée comme chez les animaux précédents. Ce type de développement trouve son équivalent dans l'expérience réalisée chez *Xenopus laevis* par Witschi et Dale (1962) qui ont administré à des têtards des traitements gynogènes pendant de courtes périodes et à des moments différents de la vie larvaire. Ils ont constaté que l'action féminisante des traitements se traduit au niveau de la gonade des mâles génétiques par la présence de régions de nature ovarienne dont la localisation antérieure, postérieure ou moyenne correspond aux moments précoces, tardifs, ou intermédiaires d'administration des traitements ; ceci confirme que la différenciation de la gonade se déroule effectivement selon une séquence antéropostérieure.

Le *second groupe* est constitué par quatre animaux (n° 7, 8, 9 et 10) du lot Pba C_{60} Stilb. qui portent des gonades dont l'épaisseur est constante et la coloration grisâtre, et dont l'aspect rappelle celui de la gonade gauche de l'animal C_{60} Stilb/15 (fig. 35, Pl. IV). De place en place, sur toute la longueur de ces gonades, des tronçons de crête ovarienne ou bien seulement des ovocytes isolés sont visibles. Chez ces animaux, la présence de nodules testiculaires d'un bout à l'autre des gonades et le faible développement de la portion ovarienne qui est parfois représentée seulement par quelques petits ovocytes blancs isolés à la surface de la glande s'expliquent si l'on admet que le diéthylstilbœstrol a exercé une action féminisante plus faible que celle du benzoate d'œstradiol.

Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par l'existence de 6 animaux de sexe mâle observés uniquement dans le lot C_{60} Stilb. Ceux-ci constituent le *troisième groupe*. Quatre d'entre eux portent des testicules identiques aux testicules des mâles témoins (fig. 30, Pl. IV) alors que deux autres possèdent des testicules d'une forme moins régulière présentant sur leur longueur quelques étranglements qui traduisent sans doute des inhibitions partielles dle la différenciation sexuelle mâle.

Les animaux intersexués que nous venons d'étudier représentent vraisemblablement deux types d'intersexualité : l'une est provoquée par des traitements dont l'intensité de l'action féminisante a varié

dans le temps, la féminisation obtenue, de totale est devenue partielle ou nulle selon les niveaux considérés ; l'autre est provoquée par une action féminisante dont l'intensité a été moindre et qui n'a entraîné à tous les niveaux de la gonade qu'une féminisation partielle ou nulle.

II. Evolution des gonades des animaux des lots Pba B_{57} DK et Pba A_{61} DK.

Nous allons considérer maintenant les résultats des élevages après la métamorphose d'animaux préalablement féminisés.

Lot Pba B_{57} DK.

A la métamorphose, 37 animaux ont été sacrifiés et disséqués, ils étaient tous de sexe femelle ; 30 animaux ont été mis en élevage. Ces animaux sont morts avant d'avoir été utilisés pour la reproduction. Le dernier d'entre eux est mort en Août 1960, soit 3 ans après la métamorphose, pendant cette période 14 animaux ont été disséqués et fixés, il y avait 13 femelles et un intersexué. Les femelles présentaient des degrés variables de l'évolution ovarienne, les plus âgées portaient des oviductes larges et sinueux ainsi que des ovaires bien développés dont les ovocytes pigmentés étaient proches de la maturité. L'animal Pba B_{57} DK/II, intersexué, est mort en mai 1960 âgé de plus de 3 ans. Ses gonades sont représentées sur la figure 38, planche IV. Elles ressemblent aux testicules des mâles témoins de même âge, elles sont de forme cylindrique allongée, leurs extrémités sont arrondies. Elles mesurent environ 5 mm de longueur et 1,5 mm de largeur. Elles ont une coloration sombre qui est due à la présence de pigment noir dans la partie profonde de l'albuginée. Elles pourraient être identifiées aisément comme des testicules sans la présence d'ovocytes blancs qui font saillie à leur surface. Ceux-ci sont bien visibles du côté externe, à la partie antérieure de la gonade droite. Plus postérieurement, nous remarquons la présence de plages grisâtres qui apparaissent comme des cicatrices à la surface de la glande. D'autres ovocytes, moins nombreux, étaient présents sur la gonade gauche mais ils ne sont pas visibles sur la photographie. Notons enfin que nous n'avons pas observé d'oviductes chez cet animal au moment de la dissection.

L'étude des coupes histologiques transversales de ces gonades permet de reconnaître l'organisation typique du testicule des Amphibiens Anoures. De nombreux tubes séminifères séparés par des cloisons conjonctives épaisses sont disposés radiairement. Ils s'ouvrent, vers la partie centrale de la glande, dans les canaux du *rete testis*. Ces derniers entrent en communication avec le mésonéphros par les canalicules efférents dont on observe les sections au niveau du hile de la glande, puis avec le canal de Wolff. Les canalicules sont au nombre de 9 sur le côté droit et de 8 sur le côté gauche, ils s'échelonnent sur toute la longueur des gonades. La paroi des tubes sémi-

nifères est recouverte par des spermatogonies peu nombreuses accompagnées par des cellules folliculaires ; on peut également observer quelques amas de spermatogonies secondaires. Ce sont les seules étapes de la spermatogenèse que nous pouvons observer. La lumière des tubes séminifères est large ; dans de rares cas, nous y avons observé des amas de spermatozoïdes en cours de dégénérescence dont les têtes sont fragmentées en petits éléments tordus ou spiralés. Dans la plupart des tubes nous avons noté la présence de macrophages dont le diamètre est de l'ordre de 25 μ, dans le cytoplasme de certains d'entre eux se retrouvent des fragments de spermatozoïdes en dégénérescence. Nous n'avons pas observé de spermatozoïdes dans les canaux du *rete testis*, ni dans les canalicules efférents, ni dans les tubules collecteurs, ni dans le canal de Wolff. Ces aspects correspondent à ceux rencontrés dans le testicule de la grenouille rousse vers les mois d'Avril et Mai, au début d'un nouveau cycle spermatogénétique ; à ce moment, le testicule renferme encore des masses de spermatozoïdes en cours d'involution (Gallien, 1940 a). La période de la reproduction de *Pelobates cultripes* étant assez voisine de celle de *Rana temporaria*, il est probable que les cycles spermatogénétiques se déroulent selon un rythme comparable dans les deux espèces.

Les gonades sont entourées d'une membrane albuginée de 25 μ d'épaisseur environ sous laquelle sont disposés de très nombreux mélanophores dont certains s'engagent, sur une courte distance, vers le centre de la glande, le long des cloisons qui séparent les tubes séminifères. L'albuginée est discontinue à la partie apicale de la gonade. C'est à ce niveau que nous avons observé les ovocytes visibles macroscopiquement à la surface des gonades. Les figures 90 et 91, planche IX, montrent deux aspects de leur disposition. Les deux lames de l'albuginée se replient vers l'intérieur de la glande et ménagent un sillon où sont disposés les ovocytes et un réseau intriqué de canaux ramifiés. Ces canaux ont une structure identique à celle des canaux du *rete testis* avec lesquels ils sont en communication. Souvent, ils s'appliquent très étroitement à la surface des ovocytes qu'ils enveloppent parfois complètement (fig. 91, Pl. IX). L'écoulement du cytoplasme d'un ovocyte à l'intérieur d'un de ces canaux est visible sur la figure 90, planche IX.

Parfois des éléments cellulaires dont l'aspect est identique à ceux des canaux du *rete testis*, et sans relation avec ces derniers, sont appliqués contre le cytoplasme des ovocytes et nous avons retrouvé des éléments sphériques identiques à ceux que nous avons décrits plus haut à propos de l'animal Pba C_{60} Stilb/14. La plupart des ovocytes sont entassés à la surface de la gonade, enveloppés par des cellules folliculaires et recouverts par le péritoine. Nous avons observé quelques ovocytes en cours de dégénérescence dont le cytoplasme était marqué de petites plages claires ; l'un d'entre eux, contenu dans la lumière d'un canal du *rete testis* n'était plus reconnaissable que par la disposition circulaire des nucléoles de la vésicule germi-

native contenus à l'intérieur d'un très fin réseau fibrillaire. Enfin, nous avons également relevé la présence de quelques ovocytes à l'intérieur même des tubes séminifères parmi les spermatogonies. Le diamètre de l'un d'eux atteignait 350 µ alors que celui des autres ovocytes observés par ailleurs à l'intérieur des testicules était de l'ordre de 150 µ ; à l'intérieur de cet ovocyte, nous avons remarqué la présence de plaquettes vitellines.

Les gonades de l'animal Pba B_{57} DK/II que nou venons de décrire sont intersexuées mais les éléments de nature testiculaire prédominent largement. Les structures ovariennes existent dans les parties apicales des deux gonades où la membrane albuginée est interrompue. A ce niveau, les tubules du *rete testis* entrent en contact étroit avec les ovocytes. Ce contact a pu se réaliser grâce à la présence dans la partie ovarienne de cellules d'origine médullaire qui ont élaboré des structures qui ressemblent aux canaux du *rete* et que nous avons déjà décrites. Certaines sont en communication avec les canaux du *rete testis,* d'autres restent aveugles, isolées parmi les ovocytes et elles sont subsphériques ou bien étroitement appliquées à leur surface. Ce réseau de tubules tend petit à petit à englober un plus grand nombre d'ovocytes, ceux-ci se trouvent intégrés dans la masse de la glande ; à la limite, la membrane albuginée se referme presque complètement et il ne reste plus à l'extérieur de celle-ci que des vaisseaux sanguins et de petits amas cellulaires où se reconnaissent encore des structures canaliculaires. Ces régions correspondent aux plages d'aspect cicatriciel que nous avions observées à la surface des gonades.

Il est impossible de préciser quels étaient, au moment de la métamorphose, l'aspect et la structure des gonades de l'animal Pba B_{57} DK/II à partir desquels se sont élaborés ceux que nous venons de décrire. Cependant, la comparaison de la figure 89 (Pl. IX) (animal Pba C_{60} Stilb/14) avec les figures 90 et 91 (Pl. IX) (animal Pba B_{57} DK/II) permet d'envisager le passage d'une structure intersexuée à l'autre en tenant compte du développement de la membrane albuginée et de l'appareil canaliculaire du *rete testis.*

Lot Pba A_{61} DK.

60 animaux ont été injectés pendant la vie larvaire, 27 animaux ont été fixés et disséqués à la métamorphose, ils étaient tous de sexe femelle, 26 animaux ont été mis en élevage. L'élevage n'a pas été conduit au-delà de 2 années en raison de la mortalité. Les animaux ont été disséqués et fixés, il y avait 22 femelles et 4 intersexués.

L'un d'eux (Pba A_{61} DK/I) mort le 28-12-62, présentait sur le côté gauche un très gros nodule testiculaire en forme de haricot, légèrement concave sur la face interne, long de 7 mm, large de 3 mm. La gonade droite était longue de 8 mm (fig. 37, Pl. IV). Elle comprend une bandelette ovarienne antérieure, godronnée et un nodule testiculaire postérieur à la surface duquel des ovocytes blancs sont visibles. Les coupes histologiques transversales de la gonade

gauche nous ont permis d'observer l'organisation des tubes séminifères qui sont complétement remplis de spermatocytes de premier et de deuxième ordres, de spermatides et surtout de spermatozoïdes fixés en faisceaux sur les cellules de Sertoli. Des spermatozoïdes mûrs sont libres à l'intérieur des tubes ou bien sont en cours d'évacuation dans les canaux du *rete testis*, au centre de la gonade, et dans les canalicules efférents. Le testicule est enveloppé d'une albuginée dont l'épaisseur varie de 5 à 8 μ et qui contient des mélanophores. A l'extérieur de l'albuginée, nous avons noté la présence d'ovocytes dont les surfaces de section apparaissent très aplaties, cette forme est due à la distension provoquée vers la périphérie par la croissance du nodule testiculaire. Ces ovocytes sont souvent accompagnés de structures canaliculaires qui ressemblent aux canaux du *rete testis* et que nous avons déjà observées chez d'autres animaux intersexués. Ces structures sont en contact avec des ovocytes ou bien elles sont isolées à la surface du testicule. Par ailleurs, en deça de l'albuginée mais à sa proximité, nous avons observé des ovocytes à l'intérieur de tubes séminifères. Les coupes sagittales de la gonade droite montrent dans la partie antérieure une constitution ovarienne et la présence de spermatozoïdes dans le nodule testiculaire postérieur dont l'albuginée est recouverte par des ovocytes de forme aplatie.

Les gonades du second animal intersexué Pba A_{61} DK/II (fig. 36, Pl. IV) sont des bandelettes ovariennes bien développées, à l'exception d'un très petit nodule grisâtre de 1 mm de long situé à l'extrémité postérieure de la gonade droite.

Les deux derniers animaux intersexués Pba A_{61} DK/III et IV observés ont des gonades dont l'aspect est comparable. Le premier porte à la partie postérieure de l'ovaire droit un nodule de 2 mm de long à la surface duquel les ovocytes sont visibles. Le second porte à la partie postérieure de chaque ovaire un nodule semblable à celui de l'ovaire droit de l'animal I (fig. 37, Pl. IV).

III. Conclusions.

L'existence d'animaux intersexués dans les deux lots : Pba B_{57} DK et Pba A_{61} DK démontre que, chez des mâles génétiques, les gonades apparemment féminisées à la métamorphose sont capables d'effectuer ultérieurement un retour vers le sexe mâle. Toutefois, ce phénomène présente un caractère exceptionnel. La réversion que nous avons observée ne provient pas d'une transformation *in situ* du territoire ovarien en tissu testiculaire mais de l'évolution d'un territoire à potentialité testiculaire qui lui est juxtaposé. Nous avons recherché à partir de quelle base structurale la différenciation tardive du tissu testiculaire pouvait s'effectuer. L'examen des coupes histologiques transversales d'ovaires d'animaux féminisés fixés à la métamorphose nous a permis de noter, dans l'ovaire gauche de l'animal Pba B_{57} DK/6, l'existence tout à fait exceptionnelle, dans

la paroi du sac ovarien, d'un groupe de quelques cellules germinales dont les noyaux clairs et lobés sont au repos alors que le cortex ovarien contient des auxocytes et de nombreux ovocytes synaptiques. Ces cellules sont identiques aux gonies indifférenciées que l'on observe dans les testicules à ce stade du développement. Elles représentent, avec les cellules du sac ovarien qui les entourent, un groupe cellulaire susceptible d'évoluer en un nodule testiculaire (fig. 86 et 87, Pl. IX). Lorsque le nodule testiculaire s'accroît il refoule à sa périphérie les tissus de nature ovarienne maintenus à l'extérieur de l'albuginée. Le développement testiculaire peut cependant induire la transformation des cellules de la thèque des ovocytes en des structures canaliculaires comparables aux canaux du *rete testis* ; ces cellules, issues de la paroi du sac ovarien, ont en effet la même origine, médullaire, que les cellules initiales des canaux du *rete*. Parfois, l'abouchement peut s'effectuer entre les deux réseaux de canaux et les ovocytes sont progressivement englobés dans la masse du testicule. Enfin, la présence de quelques ovocytes isolés à l'intérieur des tubes séminifères représente chez quelques individus, un autre aspect de l'intersexualité que nous avons parfois observé.

B. — *Triturus alpestris.*

Deux séries expérimentales ont été réalisées, l'une en 1957, l'autre en 1961. Nous envisagerons successivement, pour les deux séries, les observations macroscopiques puis l'étude histologique des gonades.

I. — Première série expérimentale (lots TA A_{57} DK_1 et TA C_{57} DK_3).

9 animaux du lot A_{57} DK_1 et 6 du lot C_{57} DK_3 (cf. Tableau IV, p. 36) ont été mis en élevage après la métamorphose ; en raison de nécessités matérielles les 15 animaux ont été élevés groupés et ont constitué le lot TA_{57} DK.

A l'âge de deux ans, ces animaux, devenus adultes, avaient l'aspect extérieur de femelles, en particulier leur dos était de coloration sombre, sans crête dorsale et les lèvres du cloaque étaient peu saillantes. L'élevage de lots témoins dans les mêmes conditions au laboratoire nous a montré que les mâles arrivent à maturité sexuelle et acquièrent leur parure nuptiale caractéristique vers l'âge de 20 mois. A l'âge de deux ans, nous avons tenté d'accoupler individuellement les animaux du lot TA_{57} DK avec des mâles standard. Aucune ponte ne fut obtenue pendant les 5 mois qu'a duré l'expérience. Vers la fin de celle-ci un animal présentait un aspect curieux, il portait en effet une petite crête dorsale claire tachetée de noir et son cloaque était nettement hypertrophié.

Cet animal *TA_{57} DK/2* a été autopsié à l'âge de 27 mois. Nous avons noté l'existence de 2 testicules bien développés, symétriques,

en forme de haricot, dont la concavité était orientée vers le mésentère médian. Ils mesuraient 8 mm de long et 3 mm de large et l'on pouvait distinguer à leur surface des plages de teinte différente ; l'une antérieure, blanche, correspondant à la zone des cystes à spermatogonies et spermatocytes, l'autre postérieure, jaunâtre, à la zone des cystes à spermatozoïdes.

A l'extrémité postérieure du testicule droit, nous avons observé un amas de plusieurs ovocytes de taille variable dont l'un d'eux, pigmenté, atteignait la taille d'un ovocyte à maturité. Sur le testicule gauche, et disposé symétriquement, il existait une petite masse bourgeonnante de coloration blanchâtre au niveau de laquelle nous n'avons pas observé d'ovocytes. Les canaux déférents, bien visibles, étaient larges et sinueux et l'animal portait, sur le côté gauche, un oviducte. Il était évident que nous avions affaire à un individu préalablement féminisé qui effectuait une conversion vers le sexe mâle.

Au cours des mois suivants, une petite crête dorsale claire, tachetée de noir, est apparue chez d'autres animaux, accompagnée ou non d'un gonflement du cloaque. Les 11 animaux restants du lot ont été autopsiés et fixés au mois de Novembre 1959 soit à l'âge de 32 mois.

Nous avons constaté parmi eux la présence de 7 femelles, de 2 intersexués et de 2 mâles. Les 7 femelles portaient des ovaires bien développés qui contenaient de nombreux ovocytes mûrs pigmentés ; 6 d'entre elles étaient dépourvues d'oviductes, chez l'une l'ostium gauche prolongé par un très court segment de l'oviducte figurait un petit sac blanc suspendu à l'avant de la cavité abdominale, la dernière femelle portait à droite une masse blanche d'aspect identique et à gauche, un oviducte développé et sinueux.

Etude de cas concrets.

L'animal Ta_{57} *DK/1* est, de tous les animaux du lot A_{57} DK, celui dont la parure nuptiale était la plus proche de celle des mâles standards. Les lèvres du cloaque étaient très saillantes et la crête dorsale particulièrement bien développée Il portait sur le côté gauche un testicule de 7 mm de long et 3 mm de large et du côté droit (fig. 47, Pl. V) une masse testiculaire ovoïde beaucoup plus volumineuse de 12 mm de long et 4 mm de large. Nous avons noté la présence dans sa région postéro-interne d'une petite masse testiculaire accompagnée, au niveau de l'insertion du mésorchium, de quelques ovocytes de grande taille en cours d'atrésie. Les canaux déférents étaient sinueux, larges et pigmentés et l'oviducte gauche était présent. Il est visible sur la figure sous la forme d'une mince bandelette blanche.

L'animal TA_{57} *DK/3* présentait un cloaque d'aspect femelle aux lèvres éversées et très peu saillantes ainsi qu'une petite crête dorsale. La gonade gauche (fig. 46, Pl. V) et la gonade droite avaient le

même aspect. Nous observons une petite bandelette ovarienne qui contient de nombreux ovocytes mûrs et qui porte à son extrémité antérieure une masse testiculaire plurilobée, blanche, à la surface de laquelle sont visibles les cloisons des cystes. Cette masse se prolonge tout le long du côté externe de la bandelette ovarienne par un cordon de même couleur et de même aspect. Chez cet animal, les deux oviductes étaient présents, dilatés et très sinueux, dans le même état de développement que chez des femelles matures. Nous avons noté la présence des canaux déférents longeant les oviductes sur leur côté interne. Leur taille était proche de celle atteinte par les canaux déférents des animaux précédents. L'étude histologique des oviductes nous a permis de constater l'identité de leur structure avec celle des oviductes des femelles témoins matures ; la lumière de ces canaux est virtuelle, elle est occupée par les plis épais de l'épithélium constitué de cellules glandulaires à mucus dont le cytoplasme est à peine coloré par le glychémalun-éosine lorsqu'il s'agit de la partie antérieure de l'oviducte alors qu'il devient très éosinophile pour les cellules de la partie terminale, ce qui correspond (fig. 46, Pl. V) à un changement de teinte de l'oviducte à la hauteur de l'extrémité postérieure de la gonade. Nous avons observé également le canal déférent, il est accolé à l'oviducte et enveloppé avec lui à l'intérieur de la même lame péritonéale. Son diamètre est de l'ordre de 170 μ et sa lumière est bordée de hautes cellules ciliées.

L'animal TA_{57} *DK/4* portait un cloaque de type femelle et une petite crête dorsale à peine marquée. Les gonades (fig. 45, Pl. V) sont des ovaires qui contiennent de nombreux ovocytes mûrs. Seule la gonade gauche porte à son extrémité antérieure un petit nodule testiculaire blanchâtre de 3 mm de long et de forme irrégulière. L'oviducte gauche est présent et il est bien développé ; du côté droit seul l'ostium et une très courte portion de l'oviducte se sont différenciés, ils sont représentés par un petit sac très court de couleur blanche, suspendu dans la cavité générale.

L'observation macroscopique de ces animaux nous a permis de retrouver l'inhibition partielle de la différenciation des oviductes que nous avions observée dès la métamorphose chez les animaux des mêmes lots traités par le benzoate d'œstradiol. Nous constatons que l'inhibition réalisée à ce moment est définitive. Les oviductes présents sont stimulés, plus particulièrement chez les animaux intersexués dont les éléments testiculaires sont les moins développés par rapport à la masse ovarienne ; chez les autres animaux, ce ne sont plus que de minces bandelettes blanches (fig. 47, Pl. V). Elles sont cependant beaucoup plus larges que les oviductes qui persistent chez les mâles standard adultes sous la forme de filaments blancs très ténus (fig. 44, Pl. V).

Nous remarquons, d'autre part, que les éléments ovariens des gonades intersexuées occupent dans tous les cas une disposition postéro-interne par rapport aux éléments testiculaires.

II. — Seconde série expérimentale (lots TA A_{61} T, TA A_{61} DK_1, TA B_{61} DK_1, TA C_{61} DK_1).

Dans le but de renouveler les observations effectuées sur la série expérimentale de 1957, nous avons traité par le benzoate d'œstradiol des larves réparties en plusieurs lots (Tableau XIV).

TABLEAU XIV. — Tableau récapitulatif de la série expérimentale de 1961 chez *Triturus alpestris*.

Lot expérimental		TA A_{61}T	TA $A_{61}DK_1$	TA $B_{61}DK_1$	TA $C_{61}DK_1$
Nombre d'animaux mis en traitement		10	10	20	23
Stade au début du traitement		st. 51	st. 51	st. 46-47	st. 51
Traitement. Concentration hormonale		lot témoin	Benzoate d'œstradiol 600 γ/l	Benzoate d'œstradiol 600 γ/l	Benzoate d'œstradiol 600 γ/l
Durée du traitement		55 jours	60 jours	60-65 jours	60 jours
Mortalité		2	2	7	7
Nombre d'animaux mis en élevage après la métamorphose		8	8	13	16
Age au moment de l'autopsie		12 mois	12 mois	14 mois	13 mois
Nombre d'animaux autopsiés		8	7	12	10
Répartition des sexes à l'autopsie	♂	4	0	0	2
	⚥	0	2	7	3
	♀	4	5	5	5

Le traitement hormonal a été appliqué à des stades plus tardifs que précédemment. Tous les animaux survivants au moment de la métamorphose ont été mis en élevage. Ils ont été sacrifiés à l'âge de 12, 13 et 14 mois ; à ce moment, le sexe n'est pas reconnaissable extérieurement, nous n'avons relevé entre les animaux aucune différence au niveau du cloaque ou de la coloration du dos.

Dans le lot TA A_{61} T, la dissection nous a permis d'observer l'état de développement atteint par les gonades mâles et femelles et nous avons pu constater que les deux sexes étaient représentés à égalité. Les figures 39 et 40, planche V, correspondent à des animaux mâle et femelle témoins dont les corps adipeux ont été enlevés afin de faciliter l'observation des gonades. Les oviductes sont présents chez

les animaux des deux sexes mais ils sont plus larges chez la femelle où ils commencent à devenir sinueux.

Les ovaires sont constitués de très nombreux ovocytes blancs, ils mesurent de 10 à 12 mm de long. Les testicules sont plus globuleux et plus courts, ils mesurent de 5 à 7 mm de longueur ; on distingue, à leur surface, les limites des cystes sauf au niveau de leur extrémité antérieure qui est lisse et très effilée. Nous n'y avons pas observé de plages de coloration différente comme sur les testicules des adultes.

Les ovaires des femelles des lots TA A_{61} DK_1, TA B_{61} DK_1 et TA C_{61} DK_1 mesurent 10 à 12 mm de longueur en moyenne. Leur aspect est comparable à celui des ovaires des témoins. Cependant, les bandelettes ovariennes ont un aspect granuleux, elles sont constituées d'auxocytes plus dispersés que dans les ovaires des témoins. Les testicules des deux mâles du lot TA C_{61} DK_1 ont un aspect typique ils mesurent chez l'un 6 mm de longueur et chez l'autre 9 mm.

La plupart des gonades des individus intersexués ont le même aspect. Elles sont constituées par une bandelette d'épaisseur irrégulière dont la longueur varie de 6 à 10 mm selon les individus. Du côté externe, le contour de la bandelette est régulier et rectiligne, en revanche du côté interne, au niveau du hile de la gonade, tout le long du point de fixation de celle-ci sur le mésogonium, de nombreux petits ovocytes blancs sphériques sont visibles. Nous pouvons observer de tels ovocytes sur les gonades des animaux *TA* A_{61} DK_1/C et *TA* B_{61} DK_1/D (fig. 42 et 43, Pl. V). Un seul animal, *TA* B_{61} DK_1/A, portait des gonades d'un aspect tout à fait particulier (fig. 41, Pl. V). Elles se présentaient comme des grappes de nombreuses petites masses blanches globuleuses qui correspondaient à des ovocytes ou bien à des cystes testiculaires, ce que nous a confirmé l'étude histologique ultérieure.

Nous avons remarqué, en outre, que l'aspect des gonades était symétrique pour chaque animal (fig. 41, 42, et 43, Pl. V). L'observation macroscopique nous a permis de constater l'absence d'oviductes différenciés chez tous les animaux traités par le benzoate d'œstradiol. Seuls les ostiums en cul-de-sac étaient présents à la partie antérieure de la cavité générale. Enfin, nous avons pu observer une disposition particulière des canaux collecteurs du rein chez des animaux traités. On sait, depuis les travaux de de Beaumont chez *Triturus cristatus* (1933 a) comment s'effectue après la métamorphose l'évolution des canaux collecteurs du mésonéphros chez les individus castrés, chez les mâles et chez les femelles. Nous avons noté chez les témoins de *T. alpestris* sacrifiés à 12 mois, la disposition caractéritique de ces canaux selon le sexe. Alors que chez le mâle la plupart des canaux longent le canal de Wolff pour s'aboucher avec lui dans sa partie terminale, chez la femelle ils se jettent dans le canal de Wolff indépendamment les uns des autres après un

court trajet oblique vers l'arrière. C'est cette dernière disposition que nous avons observée chez les individus intersexués (fig. 42, Pl. V). Il apparaît donc que, chez ces individus, les éléments ovariens ont pu empêcher la réalisation de la disposition des canaux collecteurs du type mâle, qui est également celle du type neutre, comme cela se produit normalement chez la femelle.

III. — Etude histologique de quelques gonades intersexuées.

Animal témoin TA A_{61} *T/E* (fig. 39, Pl. V), sacrifié à 12 mois. Les coupes histologiques longitudinales du testicule gauche nous ont permis d'observer au niveau de la partie effilée antérieure et de la bordure externe du testicule, de nombreuses spermatogonies primaires dont les noyaux sont clairs et lobés. La masse du testicule est occupée par des cystes qui contiennent des spermatogonies secondaires groupées en plusieurs petits amas d'une quinzaine environ, entourés de cellules folliculaires. Vers l'extrémité postérieure du testicule, du côté interne, nous avons observé quelques cystes peu nombreux qui contiennent des spermatocytes de premier ordre aux premiers stades de la prophase de la méiose.

Animal TA A_{61} DK_1/C (fig. 42, Pl. V), sacrifié à 12 mois. Dans la gonade gauche, les spermatogonies primaires et les cystes à spermatogonies secondaires affectent la même disposition que chez l'animal précédent. En revanche, nous avons noté l'absence de spermatocytes de premier ordre. De nombreux auxocytes sont présents à la face interne de la gonade, quelques autres, rares, sont situés à l'intérieur de cystes à spermatogonies secondaires. Ces ovocytes ne présentent aucun signe de dégénérescence, leur diamètre moyen est de l'ordre de 100 µ et celui de leur vésicule germinative où se reconnaissent des chromosomes en écouvillon est de l'ordre de 80 µ.

Animal TA B_{61} DK_1/D (fig. 43, Pl. V), sacrifié à 14 mois. Les coupes histologiques transversales de la gonade gauche nous ont montré l'existence d'une zone à spermatogonies primaires disposée tout le long de la face externe de la glande, celle-ci est constituée principalement de cystes à spermatogonies secondaires, cependant que les auxocytes sont situés sur le côté interne, au niveau du hile. La plupart des auxocytes sont intacts, ils sont entourés par des cellules folliculaires et par une mince gaine de tissu conjonctif. Il arrive cependant que le contour circulaire de certains d'entre eux présente des échancrures dont l'aspect rappelle les vacuoles de résorption observées au niveau des vésicules thyroïdiennes. Ces échancrures sont localisées en regard des noyaux des cellules folliculaires et elles correspondent vraisemblablement à un début d'activité phagocytaire de ces cellules. Enfin, nous avons pu observer quelques follicules vides dont il ne reste plus que les cellules folliculaires appliquées le long de la paroi conjonctive et dont la cavité est occupée par quelques macrophages à noyau lobé très basophile et à cytoplasme granuleux.

Animal TA B_{61} DK_1/A (fig. 41, Pl. V), sacrifié à 14 mois. Les coupes histologiques longitudinales de la gonade gauche montrent un mélange intime d'auxocytes de 150 à 250 µ de diamètre et de cystes testiculaires qui contiennent des spermatocytes de premier ordre, des spermatocytes de second ordre ou des spermatides en cours de spermiogenèse. Les auxocytes sont entourés de cellules folliculaires et l'ensemble est enveloppé par une mince gaine conjonctive qui les individualise, ou bien on les observe à l'intérieur même des cystes testiculaires côte à côte avec des spermatocytes ou des spermatides. Nous avons observé, çà et là, dans l'ensemble de la glande, quelques auxocytes dont le contour présente des échancrures occupées par les noyaux des cellules folliculaires.

Animal TA_{57} *DK/1*, sacrifié à 32 mois. La gonade gauche avait une taille légèrement inférieure à celle de la gonade droite (fig. 47, Pl. V). Nous avons étudié sa structure sur des coupes histologiques longitudinales. La gonade est constituée dans sa majeure partie de cystes qui contiennent des spermatozoïdes groupés en faisceaux. Dans la partie antérieure de la glande, il existe une zone étroite constituée de cystes à spermatocytes de deuxième ordre. Nous avons observé, à la face postéro-interne de la gonade une dizaine de cystes dont les spermatozoïdes sont en cours de résorption. Les faisceaux de spermatozoïdes sont désorganisés, les spermatozoïdes eux-mêmes sont tronçonnés et enchevêtrés et la paroi du cyste est épaissie par rapport à celle des cystes normaux. La gonade qui avait une forme ovoïde et massive portait dans sa région postéro-interne un petit nodule testiculaire surmonté de quelques ovocytes. Nous observons, à ce niveau, sur les coupes histologiques, des cystes contenant des spermatozoïdes et une douzaine d'auxocytes dont le diamètre varie de 150 à 500 µ. L'un d'entre eux est en cours de dégénérescence, il est entouré par de nombreuses cellules folliculaires disposées sur une couche de 18 à 25 µ d'épaisseur. Il mesure environ 500 µ de diamètre, son cytoplasme présente de nombreuses lacunes mais ne contient pas de cellules.

Animal TA_{57} *DK/2*, sacrifié à 27 mois. Nous avons effectué l'étude histologique du testicule droit sur des coupes longitudinales. Nous observons de l'avant vers l'arrière la succession caractéristique des différentes zones constituées de spermatogonies primaires, de cystes à spermatogonies secondaires, spermatocytes de premier ordre et de deuxième ordre, spermatides et spermatozoïdes. La face interne de la glande est occupée par de nombreux cystes dont les spermatozoïdes sont en cours de résorption. Dans certains d'entre eux, les plus externes, la résorption est presque achevée. La cavité du cyste est alors occupée par des cellules à noyaux ovoïdes et par d'autres cellules dont les noyaux sont plus petits et multilobés, et l'on distingue encore parmi ces cellules quelques tronçons de flagelles ou de têtes de spermatozoïdes. Nous avons retrouvé sur les coupes histalogiques les ovocytes groupés en amas au niveau de la région pos-

téro-interne. La plupart d'entre eux mesurent de 170 à 250 µ de diamètre, quelques-uns, de plus grande taille, mesurent de 600 à 700 µ de diamètre et leur cytoplasme contient du pigment à sa périphérie. Ces ovocytes sont accompagnés de cystes à spermatozoïdes, à spermatogonies secondaires et à spermatocytes de premier et de deuxième ordre. Nous avons également observé à ce niveau un ovocyte atrétique. Celui-ci ne comporte plus que la paroi conjonctive du follicule entourant un petit nodule dont le contenu d'aspect granuleux et coloré de pigment brun est envahi par des cellules dont on distingue aisément les noyaux de forme ovoïde.

D'autres ovocytes occupent dans la gonade une position aberrante, l'un parmi les spermatogonies primaires au pôle antérieur de la gonade, un autre parmi les cystes à spermatocytes, enfin trois cystes à spermatozoïdes contiennent chacun un ovocyte dont le diamètre mesure 200 µ.

Animal TA_{57} *DK/3*, sacrifié à 32 mois. Nous avons effectué sur des coupes histologiques longitudinales l'étude de la gonade droite dont l'aspect était identique à celui de la gonade gauche (fig. 46, Pl. V). La région antérieure est constituée par de gros nodules testiculaires accolés les uns aux autres et formés de cystes qui présentent les différentes étapes de la spermatogenèse. Cette partie de la glande se poursuit par une région ovarienne constituée d'ovocytes et bordée sur le côté externe par des cystes qui contiennent des spermatozoïdes mûrs et qui correspondent à la région de coloration blanche visible macroscopiquement sur le bord externe de la gonade. Certains cystes, dans cette région, contiennent des spermatozoïdes en cours de résorption. Nous avons observé la présence d'ovocytes de grande taille, ils mesurent de 700 à 800 µ de diamètre, leur cytoplasme contient de nombreuses plaquettes vitellines ainsi que du pigment brun périphérique ; leur vésicule germinative a un contour sinueux, on y observe de nombreux nucléoles et des éléments de chromosomes en écouvillon.

Dans la région qui sépare les ovocytes des cystes à spermatozoïdes, nous avons rencontré une douzaine de cystes qui contiennent à la fois des éléments germinaux en cours de spermatogenèse et des auxocytes. Ces derniers sont bien caractérisés par leur noyau dilaté et par l'aspect des chromosomes en écouvillon. Cependant leur taille est variable, les plus grands sont situés dans les cystes à spermatozoïdes, d'autres, plus petits, se rencontrent dans les cystes à spermatocytes de premier ou de deuxième ordre ou à spermatides. Par exemple, sur la même coupe histologique, nous avons pu observer d'une part à l'intérieur d'un cyste à spermatocytes de deuxième ordre deux auxocytes, parmi les cinq qu'il contient, qui mesurent 70 et 85 µ de diamètre et leur noyau 55 µ de diamètre, d'autre part deux auxocytes isolés dans des cystes à spermatozoïdes, de 140 et 175 µ de diamètre, dont les vésicules germinatives mesurent respectivement 70 et 100 µ de diamètre.

Des auxocytes sont visibles à l'intérieur de cystes testiculaires (fig. 81 et 83, Pl. VIII). Au total, dans la région ovarienne de la gonade, nous avons observé une demi-douzaine d'ovocytes en cours d'atrésie. Ils sont entourés de nombreuses cellules folliculaires disposées en une couche de 35 à 40 µ d'épaisseur. A l'intérieur de leur cytoplasme, des cellules sont aisément repérables par leurs noyaux basophiles souvent lobés. Parfois, le cytoplasme de ces cellules est visible, il contient de nombreuses granulations brunes. L'un des ovocytes en cours d'atrésie situé à proximité d'un vaisseau sanguin, nous a permis d'observer le passage de cellules, très probablement des macrophages, depuis le vaisseau jusque dans le cytoplasme de l'ovocyte à travers la gaine conjonctive qui l'entoure. La figure 82, planche VIII, permet d'observer les noyaux de quelques cellules, incomplètement dégagés de la paroi conjonctive et dont une extrémité est effilée au niveau de cette paroi. A gauche, nous reconnaissons les hématies nucléées contenues dans le vaisseau sanguin et à droite le cytoplasme finement granuleux de l'ovocyte occupé par des macrophages aux noyaux lobés.

Animal TA_{57} *DK/4,* sacrifié à 32 mois. Les coupes histologiques longitudinales de la partie antérieure de la gonade gauche (fig. 45, Pl. V) nous ont permis d'observer dans le nodule testiculaire, la présence de nombreux cystes à spermatozoïdes. Certains cystes sont en dégénérescence, leur lumière est envahie par de nombreuses cellules à noyaux lobés et c'est à peine si l'on peut reconnaître çà et là quelques fragments de têtes de spermatozoïdes. D'autre part, le long du hile de la gonade nous avons observé parmi de nombreux ovocytes mûrs qui contiennent des plaquettes vitellines une douzaine d'auxocytes en cours d'atrésie, les uns sont entourés d'une couche assez épaisse de cellules folliculaires, d'autres ont leur cytoplasme envahi par des cellules à noyau lobé et à cytoplasme granuleux.

IV. — Discussion.

Les résultats que nous venons de décrire, sont analogues à ceux que Gallien (1961, 1962 a) a observés chez *Pleurodeles waltlii* dans le cas d'une conversion rapide du phénotype sexuel s'effectuant chez des animaux âgés de 14 à 24 mois. Les testicules ont un aspect atypique, ils sont en général plus longs et plus larges que ceux des mâles standard et ils conservent, en région postérieure ou postéro-interne, des éléments ovariens caractérisés par des ovocytes parfois proches de la maturité. Les gonades des animaux TA B_{61} DK_1/A, TA B_{61} DK_1/D et TA_{57} DK/3 (fig. 41, 43 et 46, Pl. V) sont particulièrement démonstratives à cet égard.

L'étude histologique nous a permis d'observer trois phénomènes dont l'extension est variable selon les individus. Ce sont : la résorption des spermatozoïdes à l'intérieur des cystes, l'atrésie de certains ovocytes et la manifestation de l'intersexualité à l'intérieur d'un

même cyste. La masse des cystes dans lesquels a lieu la résorption est relativement peu importante par rapport à celle des cystes qui contiennent des spermatozoïdes mûrs, ceci s'explique par le fait que les animaux de la série de 1957 ont été sacrifiés à 32 mois. Ils terminaient à ce moment leur seconde poussée spermatogénétique dont nous avons retrouvé les stades évolutifs chez l'animal TA_{57} *DK/2* sacrifié à 27 mois. Nous assistons donc chez ces animaux à la résorption des cystes de la première poussée spermatogénétique, aux niveaux postérieurs et du côté interne des gonades.

La résorption des spermatozoïdes est comparable à celle que de Beaumont (1933 b) a observée au cours de l'évolution de greffons testiculaires chez différentes espèces de *Triturus* ; lorsque ces greffons ne possèdent pas de connexions avec le mésonéphros, il se produit une involution *in situ* des spermatozoïdes. La situation est identique dans le cas présent où les nodules testiculaires qui se développent au bord externe des bandelettes ovariennes sont dépourvus de connexions avec le rein. D'autre part, Aron (1924) a décrit, chez l'animal normal, une situation telle que les spermatozoïdes de certains cystes ne sont pas évacués et sont phagocytés sur place par les cellules nourricières cependant que, dans les mêmes cystes, des éléments du tissu glandulaire peuvent se développer. Ces observations permettent d'expliquer que malgré l'impossibilité de l'évacuation des spermatozoïdes, les animaux du lot TA_{57} DK ont pu développer des caractères sexuels somatiques mâles sous l'action de l'hormone mâle sécrétée par le tissu glandulaire qui s'est constitué à partir des cystes dont les spermatozoïdes avaient été résorbés. Selon Pérez (1904) qui a décrit les mécanismes de la résorption phagocytaire des spermatozoïdes chez *Triturus vulgaris*, ce sont les cellules folliculaires qui assurent la destruction des spermatozoïdes en envahissant progressivement la cavité du cyste à partir de la paroi ; selon Aron (1924) la résorption est réalisée par les cellules nourricières.

Nos observations ne nous permettent pas de trancher l'alternative. Notons toutefois que nous avons observé, à l'intérieur des cystes, des cellules à noyaux lobés ce qui nous conduit à envisager un rôle actif des macrophages dans le processus de résorption des spermatozoïdes, en effet ni les cellules de Sertoli, ni les cellules de la paroi des cystes n'ont de tels noyaux que l'on reconnaît aisément par leur grande taille et leur forme ovoïde à l'intérieur des cystes. Au fur et à mesure que le phénomène de résorption des spermatozoïdes progresserait, les cellules de la paroi des cystes subiraient une transformation en tissu glandulaire analogue à celle qui a lieu normalement lorsque les spermatozoïdes mûrs ont été évacués.

Nous avons rencontré un nombre relativement faible d'ovocytes en cours d'atrésie. Le cytoplasme est progressivement phagocyté par des macrophages venus des vaisseaux sanguins et par les cellules folliculaires dont le nombre a considérablement augmenté et dont la couche s'est épaissie autour de l'ovocyte. Au terme de l'évo-

lution du processus, il ne reste plus qu'un petit nodule rétracté, pigmenté. L'activité phagocytaire des leucocytes et des cellules folliculaires au cours de l'atrésie ovocytaire a été observée chez *Pleurodeles waltlii* par Gallien (1962 a) dans les gonades intersexuées, chez *Triturus marmoratus* et *T. helveticus* par Pérez (1903) dans les ovaires des animaux soumis au jeûne expérimental et chez *Ambystoma sp.*, par Burns (1932) et *Rana temporaria* par Gallien (1940 a) dans les ovaires d'animaux hypophysectomisés. Dans quelques cas seulement nous avons rencontré quelques macrophages libres à l'intérieur de cavités folliculaires vidées de leur contenu. Cette observation est à rapprocher du type particulier d'atrésie décrit par Pérez (1903) où l'assise des cellules folliculaires reste mince, la résorption étant effectuée par les leucocytes et conduisant à la formation d'un kyste aqueux parfois volumineux au lieu d'un petit nodule conjonctif. Contrairement à ce qui se produit chez les animaux hypophysectomisés nous n'avons pas remarqué ici que l'atrésie atteignait plus particulièrement les ovocytes dont le diamètre est supérieur à 400 µ. En effet, nous avons observé le début d'atrésie sur des ovocytes dont le diamètre est compris entre 100 et 150 µ, chez des animaux de la série de 1961. D'autre part, chez les animaux de la série de 1957, de nombreux ovocytes de grande taille (de 700 à 800 µ de diamètre), pigmentés et contenant des plaquettes vitellines ne présentent aucun signe de dégénérescence. On peut penser que le phénomène d'atrésie ovocytaire connaît ici assez peu d'ampleur en raison de la courte durée pendant laquelle a pu s'exercer l'action inhibitrice des nodules testiculaires sur les éléments ovariens alors que chez les individus intersexués décrits par Gallien (1962 a) elle avait pu s'exercer pendant plusieurs années consécutives.

Le troisième phénomène intéressant que nous avons observé est la présence simultanée, à l'intérieur de certains cystes, de cellules de la lignée germinale mâle et d'auxocytes. L'intersexualité des animaux ne réside donc pas seulement dans la présence contiguë de territoires à potentialité mâle ou femelle qui déterminent ultérieurement la cytodifférenciation des éléments germinaux qu'ils contiennent, mais encore dans le fait que les cellules germinales d'un même cyste, issues de la même spermatogonie primaire, sont capables de subir des cytodifférenciations différentes. Nous avons pu observer différents stades de l'évolution des auxocytes à l'intérieur des cystes ; en particulier, parmi des spermatocytes de premier ordre en prophase de la méiose nous avons pu identifier deux jeunes ovocytes dont les noyaux mesurent 25 µ de diamètre et contiennent des chromosomes au stade diplotène bien individualisés, alors que les noyaux des spermatocytes de premier ordre environnants ne mesurent que 14 µ de diamètre. C'est le stade le plus précoce de la divergence de l'évolution des cellules germinales d'un même cyste que nous ayons rencontré. Ultérieurement, les différences morphologiques s'accentuent (fig. 81 et 83, Pl. VIII). Cependant, les ovocytes les plus grands, observés à l'intérieur des cystes à spermatozoïdes, restent de petite

taille, leur diamètre est de l'ordre de 150 µ. Nous avons d'autre part observé la présence de cellules folliculaires appliquées autour du cytoplasme de chaque ovocyte. La plupart des cystes intersexués ne renferment qu'un seul ovocyte parmi les cellules de la lignée mâle, à l'exception de deux cystes qui contenaient l'un cinq et l'autre huit ovocytes. Ce phénomène n'a pas été observé chez les intersexués de *Pleurodeles waltlii* (Gallien, 1962 a). Cependant des poussées localisées d'ovogenèse ont été fréquemment observées dans les testicules en cours de régénération ainsi que dans les greffons testiculaires chez différentes espèces d'Amphibiens. Des exemples ont été rapportés par Meyns (1910) chez *Rana fusca* (= *temporaria*) et *R. esculenta*, par Guyénot et Ponse (1923) et Welti (1928) chez *Bufo vulgaris*, par Du Bois et de Beaumont (1927) et Beccari (1933) chez *Triturus cristatus* et par Ichikawa (1937) chez *T. pyrrhogaster*, alors que la présence d'ovocytes dans les testicules normaux, signalée par Champy (1913) et par Uchida et Hanaoka (1949), est exceptionnelle .

Peut-on rapprocher nos observations de celles des auteurs précédents en assimilant les nodules testiculaires des gonades intersexuées à des testicules en cours de régénération ? Il est assez tentant de le faire. Notons, toutefois, que nous avons rencontré les cystes intersexués à proximité des régions ovariennes des gonades, nous ne pouvons donc pas exclure totalement la possibilité d'une action inductrice de ces régions sur l'évolution des gonies des cystes les plus proches. En effet, Uchida et Hanaoka (1949) qui ont étudié la régénération des testicules chez des mâles incomplétement castrés de *T. pyrrhogaster* ont observé, dans un petit nombre de testicules régénérés, la présence d'ovocytes de tailles variées parmi des spermatozoïdes mûrs et ils ont montré que la fréquence de telles cellules est considérablement augmentée dans la majorité des testicules régénérés lorsque les animaux partiellement castrés ont reçu chaque mois, pendant environ une année après l'opération, une injection d'hormone folliculaire.

C. Conclusions de la quatrième partie.

Chez *Pelobates cultripes* et *Triturus alpestris*, l'élevage, après la métamorphose, d'animaux traités par le benzoate d'œstradiol pendant la vie larvaire nous a permis de constater la transformation, chez certains individus, des ovaires en testicules. Ces individus sont des mâles génétiques chez lesquels se développe tardivement une gonade dont la structure est conforme à la nature de leur génotype. Le retour vers le sexe génétique s'effectue selon des modalités différentes pour chaque espèce. Chez *Pelobates cultripes* où nous avions obtenu une féminisation complète au moment de la métamorphose, un petit nombre d'animaux seulement ont présenté le phénomène. Chez *Triturus alpestris*, l'aspect des gonades des animaux intersexués est variable et correspond vraisemblablement, dans le lot

TA_{57} DK par exemple, au degré variable de féminisation que nous avions observé à la métamorphose dans les lots TA A_{57} DK_1 et TA C_{57} DK_3. Certaines gonades ont un aspect voisin de celui des testicules, à l'exception de quelques ovocytes qui soulignent l'état intersexué. Cependant, d'autres gonades ont une structure beaucoup plus aberrante et l'animal TA_{57} DK/4 (fig. 45, Pl. V) qui ne possédait qu'un petit nodule testiculaire à l'extrémité antérieure de la gonade gauche représente, parmi les animaux étudiés, le cas d'une conversion récente du phénotype sexuel dans le sens mâle.

Les bases structurales du retour vers le sexe génétique sont difficiles à mettre en évidence. L'étude histologique, à la métamorphose, des gonades d'animaux traités par le benzoate d'œstradiol nous a permis d'observer chez *Pelobates cultripes* (animal Pba B_{57} DK/6) l'existence d'un très petit élément médullaire susceptible d'être le point de départ de l'évolution d'un nodule testiculaire ; chez *T. alpestris*, les gonades des individus intersexués comportaient, à des degrés divers, du tissu médullaire. La répartition topographique des éléments testiculaires et ovariens dans les gonades intersexuées en cours de conversion, notamment chez *Pelobates*, nous permet d'affirmer que les nodules testiculaires ne proviennent pas de la transformation *in situ* d'éléments ovariens mais de la croissance et du développement d'éléments d'origine médullaire. Le retour vers le sexe génétique apparaît en quelque sorte comme la régénération d'un testicule à partir d'un territoire déterminé, dont les potentialités ont été momentanément amoindries.

Il est important de remarquer que les éléments médullaires qui n'ont pas manifesté leur capacité évolutive pendant la vie larvaire, sous l'action du traitement par le benzoate d'œstradiol, restent capables de le faire, tardivement, alors même que des ovaires se sont développés et soumettent l'organisme à un régime endocrinien de type femelle souligné par le développement des oviductes (animaux TA_{57} DK/3 et DK/4, fig. 45 et 46, Pl. V). Par la suite, les éléments testiculaires deviennent capables de secréter de l'hormone mâle et ils soumettent à leur tour l'organisme à un nouveau régime endocrinien qui est caractérisé par l'apparition d'éléments de la parure nuptiale mâle chez *Triturus alpestris* ou *Pleurodeles waltlii*, et par la dégénérescence des structures ovariennes ; celle-ci est particulièrement évidente (Gallien, 1962 a) chez *Pl. waltlii* et existe à un degré moindre chez *Triturus alpestris*. Les oviductes cessent de subir l'action stimulante des ovaires et tendent à régresser. Leur état de développement permet d'évaluer le moment où l'organisme a changé de régime endocrinien, ainsi l'oviducte de l'animal TA_{57} DK/1 (fig. 47, Pl. V) est plus large que les oviductes d'un mâle standard (fig. 44, Pl. V) et cependant beaucoup moins développé que ceux des animaux TA_{57} DK/3 et DK/4 (fig. 45 et 46, Pl. V).

Witschi, en 1937, a décrit le cas représenté par une paire de parabiontes, mature, âgée de 1 an, d'*Ambystoma tigrinum* et *A. jeffersonianum* ; le premier est une femelle, le second est un indi-

vidu intersexué dont la gonade gauche contient à la fois des ovocytes mûrs et des spermatozoïdes. L'étude d'autres paires de parabiontes identiques mais immatures a permis à Witschi de conclure que la différenciation sexuelle du mâle *A. jeffersonianum* a été inhibée par la femelle *A. tigrinum* dont la différenciation sexuelle fut plus précoce. Il s'est alors produit chez le parabionte *A. jeffersonianum* un développement compensateur du cortex qui a pris un caractère ovarien, cependant que les éléments testiculaires ne se sont développés qu'à partir de l'âge de 8 mois quand la paire de parabiontes approchait de la maturité sexuelle. Dans ce cas également, la présence de l'hormone femelle, soulignée par l'état des caractères sexuels somatiques, n'a pas empêché le développement testiculaire en accord avec la constitution génétique mâle du parabionte *A. jeffersonianum*.

En outre, le rapprochement suivant nous paraît intéressant. L'aspect des gonades intersexuées observées chez les Pélobates adultes peut être rapproché de celui qui a été rencontré et décrit chez des *Ranidae* adultes intersexués, par Swingle (1926) chez *Rana catesbeiana*, par Witschi (1929 c) chez *R. temporaria* et par Christensen (1929) et Evans (1931) chez *R. pipiens*. L'aspect macroscopique des gonades de l'animal intersexué décrit par Evans est très comparable à celui des gonades de l'animal Pba A_{61} DK/1 (fig. 37, Pl. IV) que nous avons décrites. Les aspects histologiques des gonades intersexuées sont comparables également et l'auteur a remarqué que les ovocytes étaient entourés par des éléments ressemblant aux canaux du *rete testis* et dérivés des cellules constituant le sac ovarien.

L'étude des gonades intersexuées nous amène à considérer le déterminisme de la cytodifférenciation des gamètes. Celle-ci ne dépend pas directement de la nature du génotype des cellules germinales mais de la nature du territoire dans lequel elles sont situées. La démonstration en a été fournie par les résultats des croisements effectués à partir d'animaux hermaphrodites par Witschi (1923), chez *Rana temporaria*. D'autres croisements réalisés ultérieurement à partir d'animaux à phénotype sexuel inversé et fonctionnel en ont apporté la confirmation (cf. Tableau X, p. 72). Dans les gonades intersexuées, nous constatons que des cellules germinales qui possèdent le même génotype peuvent évoluer dans des directions différentes. Il s'agit d'une alternative pour chaque cellule germinale qui n'a que deux possibilités d'évolution et de différenciation, l'une dans le sens mâle, l'autre dans le sens femelle, conditionnées par des stimuli qui proviennent de l'environnement et dont nous ignorons la nature exacte. Ces stimuli peuvent s'exercer simultanément à l'intérieur d'un cyste testiculaire ; les cellules germinales répondent à l'action des uns ou des autres et chacune est dès lors phénotypiquement sexuée. Le génotype des cellules germinales qui permet indifféremment leur différenciation en gamètes mâles ou femelles est donc amphisexué.

En conclusion, chez *Pelobates cultripes* et *Triturus alpestris*, l'inversion du sexe phénotypique obtenue à la suite d'un traitement pendant la vie larvaire n'est pas stable. Le même phénomène a été observé et analysé chez *Pleurodeles waltlii* par Gallien (1962 a). Les mâles génétiques féminisés tendent à recouvrer, au cours de leur évolution ultérieure, une gonade dont la structure est conforme à la nature de leur génotype. Dans la mesure où, à la suite de l'intervention expérimentale, des éléments de nature médullaire persistent dans la gonade féminisée, ces éléments sont capables, tardivement, de se développer et de constituer un testicule. Et l'on réalise ainsi expérimentalement des individus à hermaphrodisme successif protérogyne.

DISCUSSION GÉNÉRALE.

Nous avons montré que des hormones stéroïdes, ou des substances voisines, administrées pendant la vie larvaire peuvent provoquer l'inversion partielle ou complète du phénotype sexuel chez quelques espèces d'Amphibiens. Dans les expériences de cette nature, l'interprétation des résultats, depuis que les premiers d'entre eux ont été obtenus chez les Oiseaux (Wolff et Ginglinger, 1935 ; Dantchakoff, 1935 a et b, 1936 ; Willier, Gallagher et Koch, 1935) et chez les Amphibiens (Padoa, 1936 ; Gallien, 1937), est dominée par la question qui concerne l'identité ou les relations des hormones stéroïdes administrées et des inducteurs sexuels embryonnaires dont l'existence peut être déduite de l'analyse des free-martin naturels chez les Bovidés et des free-martin expérimentaux chez les Amphibiens.

Chez les Amphibiens, la mise en parabiose ou les greffes de gonades embryonnaires provoquent, dans certaines conditions, l'inversion du phénotype sexuel dans les deux sens ; c'est-à-dire qu'une gonade mâle masculinise une gonade génétiquement femelle (Burns, 1925 a et b ; Humphrey, 1928, 1931 ; Witschi et Mc Curdy, 1929) ou bien qu'une gonade femelle féminise une gonade génétiquement mâle (Burns, 1935 ; Witschi, 1937 ; Gallien, 1963). Cette action, qui est susceptible de s'exercer à distance, conduit à la conception de l'existence d'inducteurs sexuels embryonnaires. Or les hormones sexuelles stéroïdes administrées pendant la vie larvaire sont capables d'exercer des effets tout à fait superposables à ceux-ci.

Une première voie de recherches consiste à isoler les inducteurs sexuels embryonnaires et à les comparer aux hormones sexuelles stéroïdes. Mais les inducteurs n'ayant pas été isolés à ce jour, nous ne pouvons que comparer les effets des deux catégories de substances. Nous devons toutefois nous rappeler qu'une identité des effets ne peut conduire qu'à la présomption et non à la certitude de l'identité des causes.

Une autre voie consiste à rechercher les stéroïdes sexuels dans les gonades embryonnaires et à déterminer à quel stade, selon quels processus et à quelles concentrations ils sont élaborés ? La recherche directe des œstrogènes a été effectuée dans les ovaires juvéniles chez le Poulet (Gallien et Le Foulgoc, 1958) et chez *Xenopus laevis* (Gallien et Chalumeau - Le Foulgoc, 1960) où l'œstradiol a été mis en évidence dès que la différenciation sexuelle est achevée. La recherche des stéroïdes dans les gonades au cours des premiers stades de l'ontogenèse se heurte à des difficultés techniques sérieuses, telles

que l'extrême petitesse des organes intéressés, la difficulté, voire l'impossibilité, de diagnostiquer le sexe des gonades en deçà d'un stade déterminé et la ténuité des quantités de stéroïdes présentes qui nécessitent la mise en œuvre de techniques biochimiques très sensibles sur des lots très importants d'animaux. En utilisant une méthode histochimique nous avons pu montrer, chez *Pleurodeles,* la mise en place dans les gonades, à des stades très précoces du développement, d'un système enzymatique intervenant dans la biosynthèse des hormones stéroïdes (cf. 3e partie). Ce résultat autorise la prise en considération de l'intervention éventuelle d'hormones stéroïdes dans les mécanismes normaux de la différenciation sexuelle. Il reste à démontrer toutefois la présence d'hormones stéroïdes dans les gonades embryonnaires aux stades correspondants.

Si, dans certaines conditions, les hormones miment l'action des inducteurs sexuels embryonnaires, nous savons que ce n'est pas la règle. Chez les Urodèles, par exemple, un greffon de gonade mâle embryonnaire exerce un effet androgène alors que l'hormone mâle ne provoque pas la masculinisation. Cette hormone est également sans effet sur la différenciation des gonades chez les Bovidés (Jost *et al.,* 1963) où l'effet free-martin a été décrit et analysé (Lillie, 1917). Chez *Xenopus laevis.* Chang (1953) et Mikamo et Witschi (1963) observent, à la suite de greffes de testicules juvéniles dans des larves, un effet masculinisant en même temps qu'un effet toxique sur les gonades de l'hôte ; ce dernier effet rappelle celui qui a été décrit par Gallien (1956) dans la même espèce à la suite de l'administration d'hormone mâle. Il paraît pourtant difficile de conclure que, dans les expériences de greffes, la masculinisation est le résultat direct de l'action de l'hormone mâle ; en effet, Gallien n'a pas observé d'effet masculinisant mais un effet féminisant qui se manifeste à la suite d'une inhibition différentielle des territoires cortical et médullaire. Il est d'ailleurs possible, dans le cas des greffes, d'envisager l'action simultanée d'inducteurs embryonnaires et d'hormones stéroïdes sécrétés par le testicule juvénile.

La variabilité taxinomique que nous avons confirmée pour de nouvelles espèces d'Amphibiens met en évidence le rôle que joue le substrat génétique dans la réaction des espèces aux hormones administrées, et la participation des hormones stéroïdes aux processus normaux de la différenciation sexuelle pourrait être modulée par l'intervention de protéines spécifiques (Gallien, 1959). Le lien entre le type de la réaction aux hormones stéroïdes et la nature du substrat génétique est confirmé par le fait que chez la plupart des Vertébrés l'inversion du phénotype sexuel des animaux appartenant au sexe homogamétique est réalisée par l'administration de l'hormone homologue du sexe hétérogamétique (Gallien, 1962 b). Ainsi, chez les *Ranidae,* du type ♀ XX et ♂ XY (Tableau X, p. 72) l'hormone mâle inverse le phénotype sexuel des femelles génétiques alors que chez les Urodèles et *Xenopus,* du type ♂ ZZ et ♀ ZW, c'est l'hormone femelle qui inverse le phénotype sexuel des mâles génétiques. Une

situation identique à celle des Urodèles est observée chez les Oiseaux où le sexe hétérogamétique est le sexe femelle. Nous connaissons cependant deux exceptions ; la première est représentée par le Poisson téléostéen *Oryzias latipes*, du type : ♀ XX et ♂ XY, dont le phénotype sexuel des mâles et des femelles génétiques peut être inversé respectivement par les hormones femelle et mâle (Yamamoto, 1962) ; la seconde exception est représentée par l'Opossum (*Didelphys virginiana*), du type : ♀ XX et ♂ XY, qui est féminisé par le benzoate d'œstradiol (Burns, 1950, 1956). Toutefois, il faut noter, que chez l'Opossum, la chromatine sexuelle est visible à la fois chez les femelles et chez les mâles génétiques (Graham et Barr, 1959).

Chez *Bombina variegata*, la différenciation des gonades n'est pas modifiée par l'administration des hormones mâle et femelle pendant la vie larvaire. Il est intéressant de souligner que, chez *Bombina*, Moskowska (1932) n'a jamais obtenu d'intersexualité consécutive à la transplantation des gonades mâles ou femelles, alors qu'une telle intersexualité est couramment observée dans les mêmes conditions chez *Bufo vulgaris* et *Triturus cristatus*. Enfin chez *Bombina*, la mise en parabiose de larves de sexe opposé n'est suivie d'aucune modification de la différenciation des gonades qui conservent leur structure typique même lorsqu'elles sont contiguës (Huchon, communication personnelle). La détermination sexuelle apparaît ainsi particulièrement stable chez *Bombina* alors qu'elle apparaît plus ou moins labile dans d'autres espèces.

La variabilité taxinomique de la réaction aux hormones stéroïdes n'est pas propre aux Amphibiens. Récemment, Kondo (1959 et 1963) a montré d'une part qu'il existe chez le Poulet des différences raciales dans l'intensité de la réponse de l'appareil génital à l'administration d'œstrogènes et d'autre part que l'intensité de la réponse chez des animaux hybrides issus du croisement de deux races est intermédiaire entre les intensités des réponses de chacune de ces deux races.

Une autre catégorie de résultats conduit à penser que les hormones administrées ne sont pas identiques aux inducteurs sexuels embryonnaires ou bien qu'elles ne miment pas exactement leur action. Il s'agit du retour au sexe génétique que Gallien (1962 a) a décrit chez *Pleurodeles waltlii* et que nous avons observé chez *Pelobates cultripes* et *Triturus alpestris*. En 1944, chez *Rana temporaria*, Gallien a montré que l'hormone femelle, même lorsqu'elle est administrée de façon permanente, n'empêche pas le retour au sexe génétique des animaux féminisés de constitution génétique mâle. Ces faits sont comparables à ceux décrits chez le Poulet par Wolff (1936) et chez *Larus argentatus* par Boss et Witschi (1947) où, en dépit de la poursuite de l'administration de l'hormone femelle après l'éclosion, les gonades des mâles génétiques féminisées pendant la vie larvaire se transforment en testicules. Chez le Poulet, Haffen (1963) a montré que dans un cortex génétiquement mâle induit expérimentalement, les ovocytes ne se développent pas, même si le

cortex est associé à une médullaire femelle. Tout se passe comme si le système génétique qui détermine dans quel sens, mâle ou femelle, se différencie la gonade embryonnaire était momentanément inhibé ou transformé à la suite de l'administration des hormones stéroïdes. L'équilibre cortico-médullaire est modifié sans que l'un ou l'autre des territoires ait perdu ses qualités intrinsèques. En outre, l'activité du système génétique sexualisant peut s'exercer tardivement, bien après la période de la vie larvaire au cours de laquelle elle s'exerce normalement ; cependant, pour qu'elle s'exprime, il est nécessaire qu'un territoire compétent, des formations médullaires par exemple, demeure présent dans les gonades des mâles génétiques féminisés ; en d'autres termes, que le caractère bisexué de la gonade embryonnaire indifférenciée soit maintenu.

On peut se demander si ce n'est pas un phénomène comparable qui se produit chez les mâles génétiques des races indifférenciées de *Rana* où le système génétique sexualisant s'exerce pendant une première période dans le sens femelle puis secondairement, au niveau des éléments médullaires du sac ovarien, dans le sens mâle. Dans ce cas, ce sont des facteurs génétiques intrinsèques qui déterminent la différenciation sexuelle femelle primitive des mâles génétiques (Hertwig, 1912 ; Witschi, 1923).

Nous savons que, chez les Amphibiens, des facteurs épigénétiques extrinsèques peuvent altérer la compétition cortico-médullaire et provoquer l'inversion du sexe phénotypique ; ce sont : l'hypermaturation des œufs, l'action pendant la vie larvaire de différents ions en solution dans l'eau d'élevage rapportée par Stolkowski et Bellec (1960) ou l'action de températures extrêmes pendant la vie larvaire. Witschi (1929 b, 1942) et Piquet (1930) ont montré que, sous l'action d'une basse température, les mâles génétiques de races différenciées de *Rana temporaria* différencient d'abord des ovaires tout comme les mâles des races indifférenciées puis développent des testicules après la métamorphose. Dans ce dernier cas, de même que dans celui représenté par les mâles des races indifférenciées ou par les animaux qui ont effectué un retour au sexe génétique chez *Pleurodeles*, *Pelobates* et *Triturus alpestris*, il existe un hermaphrodisme successif protérogyne.

Chez les Oiseaux, certains facteurs physiques ou chimiques sont susceptibles de se comporter comme des facteurs épigénétiques à l'égard de la différenciation sexuelle des gonades. Ainsi, chez le Poulet, l'administration aux embryons de Rayons X (Wolff et Salzgeber, 1949 ; Salzgeber, 1957) ou d'ypérite (Salzgeber, 1963 a) entraîne l'apparition d'individus intersexués partiellement féminisés. Or, les Rayons X (Wolff et Kieny, 1962) et l'ypérite (Salzgeber, 1963 b, 1964) administrés dans les mêmes conditions se comportent comme des agents tératogènes à l'égard des membres des embryons. Il n'est pas sans intérêt de rappeler les malformations obtenues chez *Xenopus* avec l'ypérite par Tschumi (1954) et celles que nous avons obtenues chez *Pelobates* et *Pelodytes* avec le benzoate d'œstradiol ou

le propionate de testostérone. Enfin, par la méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*, Salzgeber (1957) a pu montrer que certains composés chimiques toxiques inhibent électivement le développement de l'un ou l'autre des composants de la gonade. Ainsi, la trypaflavine inhibe la médulla alors que la colchicine inhibe le cortex.

Nous sommes donc amené à nous demander si, de même que les facteurs physiques et chimiques que nous avons cités, les hormones stéroïdes ne se comportent pas à l'égard de la différenciation sexuelle des gonades comme des facteurs épigénétiques extrinsèques. Un certain nombre de faits plaident en faveur de cette interprétation.

En premier lieu, ce sont les rôles importants que peuvent jouer les hormones stéroïdes dans le métabolisme et les activités cellulaires. Si ces rôles pouvaient déjà être pressentis en raison de l'activité physiologique des hormones stéroïdes leur connaissance précise est cependant relativement récente par rapport à la découverte et à la synthèse des hormones stéroïdes elles-mêmes et nous citerons les principaux actuellement connus. Les hormones stéroïdes peuvent modifier la nature des surfaces cellulaires (Willmer, 1961) et de cette manière elles peuvent ménager à l'intérieur même de la cellule les possibilités de contacts d'enzymes avec leur substrat. Les hormones œstrogènes peuvent participer elles-mêmes en tant que coenzymes au métabolisme respiratoire (Engel, 1959 ; Villee et Hagerman, 1961 ; Villee, 1962) et le diéthylstilbœtrol a les mêmes propriétés (Glass *et al.*, 1961). Les hormones stéroïdes interviennent dans les synthèses protéiques (Tomkins et Maxwell, 1963 ; Garren *et al.*, 1964) ainsi que dans la synthèse des acides nucléiques (Rickenbacher, 1961, Williams-Ashman *et al.*, 1964). Elles perturbent la segmentation et le développement embryonnaire (Töndury et Cagianut, 1951 ; Daniel, 1964) et elles provoquent un arrêt des mitoses en début de métaphase (Bodenstein, 1954). Enfin, les hormones stéroïdes agissent sur certains systèmes enzymatiques soit qu'elles les activent (Scheib, 1962) soit qu'elles les inhibent (Yielding et Tomkins, 1962 ; Ferrari et Arnold, 1963 a et b, Weissmann et Thomas, 1964).

En second lieu, les résultats d'inversion du sexe ont été obtenus au moyen de concentrations ou de doses extra-physiologiques d'hormones à l'exception des concentrations infinitésimales de propionate de testostérone qui masculinisent les gonades chez *Rana sylvatica* (Mintz et Witschi, 1946 ; Mintz, 1948). Il nous semble plausible de considérer que, dans de telles conditions, les hormones se comportent comme des facteurs épigénétiques extrinsèques capables d'altérer la compétition cortico-médullaire, du résultat final de laquelle dépend la différenciation sexuelle de la gonade et capables de conduire à des effets paradoxaux, comme chez les *Ranidae* et les Urodèles. L'analyse de la féminisation des mâles génétiques chez les Urodèles à la suite d'un traitement par la testostérone a permis de mettre en évidence l'action différentielle de l'hormone sur les deux

territoires de la gonade indifférenciée, le cortex et la médulla. Une action différentielle du même ordre permet d'expliquer les résultats obtenus, masculinisation ou féminisation, chez *Rana dalmatina* avec la progestérone et la désoxycorticostérone (Vannini, 1950 b). Est-ce par une altération de la compétition cortico-médullaire que les hormones exercent des effets orthodoxes conformes à leur type sexuel ? Chez *Salamandra* et *Pelodytes* nous avons constaté, chez les mâles génétiques traités par le benzoate d'œstradiol, un arrêt de la migration des gonocytes vers la médulla et nous pensons que cet arrêt de la migration des gonocytes est la manifestation d'une modification de la prévalence d'un territoire par rapport à l'autre.

Les hormones stéroïdes sont-elles identiques aux inducteurs sexuels embryonnaires ou bien interviennent-elles dans les processus de la différenciation sexuelle en tant que facteurs épigénétiques extrinsèques ? Ces deux interprétations des résultats qui semblent opposées ne nous paraissent pas inconciliables. La généralité des effets des hormones stéroïdes exogènes administrées aux larves est remarquable et ne peut être sous-estimée. On peut concevoir que ces hormones interviendraient, au niveau des gonades en cours de différenciation, sur les mécanismes responsables de la synthèse d'hormones stéroïdes, ces dernières participant normalement aux processus de la différenciation en même temps que des protéines qui conféreraient à ces processus leur spécificité. Les hormones administrées interfèreraient alors avec les mécanismes enzymatiques normaux qui traduisent eux-mêmes des activités géniques ; cette interférence étant liée vraisemblablement à la nature du sexe génétique des larves éprouvées. D'une part, les hormones administrées pourraient mimer l'action des inducteurs sexuels embryonnaires supposés lorsque l'hormone homologue du sexe hétérogamétique est administrée aux individus de sexe homogamétique ; c'est le cas de l'hormone mâle chez les *Ranidae* et de l'hormone femelle chez les Urodèles et chez *Xenopus*. D'autre part, dans les autres conditions expérimentales, les hormones administrées se comporteraient comme des facteurs épigénétiques extrinsèques. De plus, le retour au sexe génétique des animaux à phénotype sexuel inversé nous amène à concevoir que, durant l'ontogenèse, le système génétique sexualisant ne s'exerce pas avec une intensité constante ou bien qu'il ne possède pas une sensibilité constante aux facteurs épigénétiques extrinsèques. Telle est l'interprétation qui nous semble le mieux rendre compte des faits actuellement connus chez les Amphibiens.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Chez plusieurs espèces d'Amphibiens, les traitements pendant la vie larvaire par le benzoate d'œstradiol ou le propionate de testostérone nous ont permis de confirmer l'existence d'une variabilité d'ordre taxinomique dans la réaction aux traitements hormonaux et nos résultats complètent ceux obtenus par les autres auteurs.

A l'exception de *Bombina variegata* dont la réaction est nulle, les espèces utilisées ont été féminisées totalement ou partiellement par le benzoate d'œstradiol. Le propionate de testostérone a été sans action ou bien il a exercé, chez les Urodèles, une action inhibitrice au niveau des tissus qui dérivent du blastème néphrétique.

Certains caractères sexuels somatiques, dès lors qu'ils ont atteint leur état de compétence, ont réagi de façon orthodoxe à l'action des hormones administrées.

En outre, les hormones ont exercé, chez *Pelobates* et *Pelodytes*, une action tératogène au niveau des membres et, chez *Triturus alpestris* et *T. helveticus*, une action tératogène sur les canaux de Müller et une action pathogène sur le mésonéphros.

Le diéthylstilbœstrol a féminisé les gonades des mâles génétiques chez *Pleurodeles* et *Pelobates*, alors qu'il est sans action sur la différenciation sexuelle de *R. sylvatica* (Witschi, 1948), ceci confirme le type de réaction particulier des *Ranidae*.

La mise en évidence, dans les gonades larvaires de *Pleurodeles*, d'une Δ^5-3β-hydroxystéroïde déshydrogénase intervenant dans la biosynthèse des hormones stéroïdes autorise la prise en considération de la participation de ces hormones aux processus de la différenciation sexuelle normale de la gonade.

Chez *Pelobates* et *T. alpestris*, l'élevage jusqu'à l'état adulte d'animaux féminisés par un traitement administré pendant la vie larvaire a montré que l'inversion du sexe phénotypique n'est pas stable. Les animaux à sexe phénotypique inversé tendent à recouvrer progressivement des gonades dont la structure est conforme à leur sexe génétique. Ceci prouve que l'activité du système génétique sexualisant n'a pas été abolie et qu'elle peut se manifester tardivement au cours de l'ontogenèse.

RÉSUMÉ.

1) Les effets, sur la différenciation sexuelle, de l'administration pendant la vie larvaire de propionate de testostérone et de benzoate d'œstradiol sont étudiés chez *Pelobates cultripes, Pelodytes punctatus, Bombina variegata, Triturus helveticus, T. alpestris* et *Salamandra salamandra*. Les résultats confirment l'existence d'une variabilité taxinomique de la réactivité des différentes espèces aux traitements hormonaux.

2) Le benzoate d'œstradiol féminise complétement les gonades des mâles génétiques chez *Pelobates* et *Triturus helveticus*. Il féminise partiellement les gonades des mâles génétiques chez *Pelodytes, Triturus alpestris* et *Salamandra*, et il est sans action sur la différenciation sexuelle chez *Bombina*.

3) Le propionate de testostérone n'exerce aucune action sur la différenciation sexuelle des gonades chez *Bombina, Pelobates, Pelodytes* et *Salamandra*. Chez *Triturus alpestris* et *T. helveticus*, il inhibe l'organogenèse du mésonéphros et celle des gonades. *T. helveticus* est une espèce particulièrement sensible à l'administration du propionate de testostérone et elle présente de l'ascite même avec les faibles concentrations qui ne sont pas pathogènes chez *T. alpestris* ou *Pleurodeles waltlii*.

4) Le benzoate d'œstradiol stimule les canaux de Müller chez *Pelobates* et *Pelodytes*.

5) Le propionate de testostérone provoque, au moment de la métamorphose chez *Bombina* l'apparition de callosités et chez *Pelodytes* l'apparition de franges cutanées autour des orteils et la dilatation de la partie terminale des canaux de Wolff. Chez *Triturus alpestris*, il empêche la disparition des uretères primaires qui se dilatent.

6) Les deux substances ont manifesté des effets tératogènes chez *Pelodytes* et *Pelobates* au niveau des membres et, chez les Urodèles, au niveau des canaux de Müller dont la différenciation est totalement ou partiellement inhibée. Cependant, elles stimulent les parties des canaux de Müller qui se sont différenciées.

7) Chez *Pleurodeles* et *Pelobates*, le diéthylstilbœstrol a la même action féminisante que le benzoate d'œstradiol.

8) Le diméthylstilbœstrol, substance antiœstrogène, exerce chez *Pleurodeles* une action féminisante qui est cependant plus faible que celle du benzoate d'œstradiol à concentrations égales.

9) Chez *Pleurodeles,* il existe, dès le stade 43, dans les gonades indifférenciées, une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase, enzyme qui joue un rôle dans la biosynthèse des hormones stéroïdes.

10) L'activité Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénasique disparaît dans les gonades larvaires des mâles génétiques traités par le benzoate d'œstradiol.

11) Chez *Pelobates* et *Triturus alpestris,* l'élevage après la métamorphose d'individus traités pendant la vie larvaire par le benzoate d'œstradiol montre que l'inversion du sexe phénotypique obtenue à la métamorphose n'est pas permanente. Plus tard, les mâles génétiques tendent à recouvrer des gonades dont la structure est conforme à la nature de leur sexe génétique.

12) L'ensemble des résultats est discuté, en même temps que les résultats obtenus antérieurement par d'autres auteurs, afin de dégager une conception du mode d'action des hormones stéroïdes sur les processus de la différenciation du sexe chez les Amphibiens.

SUMMARY.

1) The effects upon sex-differentiation of the administration of testosterone propionate and œstradiol benzoate during the larval period are studied in *Pelobates cultripes, Pelodytes punctatus, Bombina variegata, Triturus helveticus, T. alpestris* and *Salamandra salamandra*. The results confirm the existence of a taxinomic variability in the reactivity of the different species to the hormonic treatments.

2) Œstradiol benzoate feminizes completely the gonads of the genetic males in *Pelobates* and *Triturus helveticus*. It feminizes incompletely the gonads of the genetic males in *Pelodytes, Triturus alpestris* and *Salamandra*, and it is ineffective upon the sex-differentiation in *Bombina*.

3) Testosterone propionate is ineffective upon the gonadal sex-differentiation in *Bombina, Pelobates, Pelodytes* and *Salamandra*. In *Triturus alpestris* and *T. helveticus* it inhibits the organogenesis of the mesonephros and that of the gonads. *T. helveticus* is a species peculiarly sensitive to the administration of testosterone propionate and it exhibits ascites even with the low doses which are not pathogenic in *T. alpestris* nor in *Pleurodeles waltlii*.

4) Œstradiol benzoate stimulates the Müllerian ducts in *Pelobates* and *Pelodytes*.

5) At the time of metamorphosis, testosterone propionate induces in *Bombina* the appearance of nuptial pads and in *Pelodytes* the appearance of cutaneous fringes around the toes and the enlargement of the terminal part of the Wolffian ducts. In *Triturus alpestris*, it prevents the disappearance of the pronephric ducts which undergo hypertrophy.

6) The two substances have exhibited teratogenic effects in *Pelodytes* and *Pelobates* upon the limbs and, in Urodeles, upon the Müllerian ducts the differentiation of which is completely or partly inhibited. However, they stimulate the parts of the Müllerian ducts which have differentiated.

7) In *Pleurodeles* and *Pelobates*, diethylstilbœstrol exhibits the same feminizing effect than that of œstradiol benzoate.

8) The antiœstrogenic drug, dimethylstilbœstrol, exhibits in *Pleurodeles* a feminizing effect which is, however, weaker than that of œstradiol benzoate at equal doses.

9) In *Pleurodeles,* a Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase, which plays a part in the biosynthesis of steroid hormones, can be detected as soon as stage 43 in the undifferentiated gonads.

10) The Δ^5-3 β-hydroxysteroid dehydrogenase activity disappears from the larval gonads in the genetic males when these animals have been treated with œstradiol benzoate.

11) In *Pelobates* and *Triturus alpestris,* the rearing after metamorphosis of individuals treated during the larval period with œstradiol benzoate shows that the phenotypic sex-reversal obtained at the time of metamorphosis is not permanent. Later, the genetic males have a tendency to recover gonads the structure of which is consistent with their genotypic sex character.

12) The whole of the results is discussed, together with the results from previous investigators, in order to bring out a conception about the mode of action of steroid hormones upon the processes of the sex-differentiation in Amphibians.

BIBLIOGRAPHIE.

Ackart (R. J.) et Leavy (S.) — 1939. — Experimental reversal of sex in Salamanders by the injection of œstrone. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 42, 720-724.

Amanuma (A.) — 1963. — Modification of gonadal development in *Rhacophorus schlegelii arborea* to the treatment with methyltestosterone. *J. Biol. Osaka City Univ.*, 14, 15-23.

Angel (P.) — 1950. — La chimiotératogenèse chez les Vertébrés. Doin et Cie, Paris.

Angel (F.) — 1946. — Faune de France, 45, Reptiles et Amphibiens. P. Lechevalier, Paris.

Aron (M.) — 1924. — Recherches morphologiques et expérimentales sur le déterminisme des caractères sexuels mâles chez les Urodèles. *Arch. Biol.*, 34, 1-163.

Arvy (L.) — 1962. — Présence d'une activité stéroïdo-3 β-ol-déshydrogénasique chez quelques Sauropsidés. *C. R. Acad. Sc.*, 255, 1803-1804.

Asayama (S.) — 1953. — Effect of desoxycorticosterone acetate upon the sex differentiation of gonad in *Triturus pyrrhogaster*. *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ.*, ser. D, 4, 43-49.

Asayama (S.) — 1955. — Effect of the pituitary proteins on the sex differentiation of gonad in Urodela. *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ.*, ser. D, 6, 57-66.

Asayama (S.) et Amanuma (A.) — 1957. — Modification of sex development in *Hynobius nebulosus* by administration of methyl-testosterone. *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ.*, ser. D, 8, 111-120.

Asayama (S.) et Matsuzaki (H.) — 1958. — Responses of the gonads of *Triturus pyrrhogaster* larvae to the administration of methyl-testosterone. *Zool. Magaz.*, 67, 133-137.

Asayama (S.) et Miyamori (H.) — 1957 a. — Responses of larval gonads in *Hynobius nebulosus* to the administration of estrogen. *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ.*, ser. D, 8, 129-137.

Asayama (S.) et Miyamori (H.) — 1957 b. — Feminization of embryonic gonad induced by the thiourea treatment. *Zool. Magaz.*, 66, 295-301.

Asayama (S.) et Yamamoto (H.) — 1951. — Feminizing effect of desoxycorticosterone acetate on the differentiation of gonad in *Hynobius nebulosus*. *J. Inst. Polytech., Osaka City Univ.*, ser. D, 2, 41-47.

Beaumont (J. de) — 1933 a. — La différenciation sexuelle dans l'appareil uro-génital du triton et son déterminisme. *Roux' Arch. Entw. Mech.*, 129, 120-178.

Beaumont (J. de) — 1933 b. — Hétérogreffes testiculaires chez les Urodèles. *Arch. Zool. exp. gén.*, 74, 437-459.

Beccari (N.) — 1933. — Cellule genitali femminili nella rigenerazione sperimentale del testicolo degli anfibi. *Monit. zool. Ital.*, 44, 288-298.

Bodenstein (D.) — 1954. — Effects of radiomimetic substances on embryonic development, with special reference to nitrogen mustards. *J. cell. comp. Physiol.*, 43, 179-205.

Boss (W. R.) et Witschi (E.) — 1947. — The permanent effects of early stilbœstrol injections on the sex organs of the herring gull (*Larus argentatus*). *J. exp. Zool.*, 105, 61-77.

Botte (V.) — 1963. — La localizzazione della steroide-3 β-olo-deidrogenasi nell'ovaio di pollo. *Rend. Ist. Sc. Camerino*, 4, 205-209.

Bruner (J. A.) — 1952. — Further quantitative studies on the effects of androgens on sex determination in *Ambystoma*. *Anat. Rec.*, 113, 564.

Bruner (J. A.) et Witschi (E.) — 1954. — Pluripotentiality of the mesonephric blastema and the mechanism of feminization of male Salamanders by androgenic hormones. *Anat. Rec.*, 120, 99-118.

Burgos (M. H.) et Pisanò (A.) — 1962. — Inversione sessuale della gonade di *Bufo arenarum* trattata con gonadotrofine purificate. *Arch. Zool. ital.*, 47, 177-186.

Burns (R. K.) — 1925 a. — The sex of parabiotic twins in Amphibia. *J. exp. Zool.*, 42, 31-90.

Burns (R. K.) — 1925 b. — Further observations on parabiotic amphibian larvae. *Anat. Rec.*, 31, 301.

Burns (R. K.) — 1930. — The process of sex transformation in parabiotic *Amblystoma*. I. Transformation from female to male. *J. exp. Zool.*, 55, 123-169.

Burns (R. K.) — 1931. — The process of sex transformation in parabiotic *Amblystoma*. II. Transformation from male to female. *J. exp. Zool.*, 60, 339-387.

Burns (R. K.) — 1932. — Follicular atresia in the ovaries of hypophysectomized Salamanders in relation to yolk formation. *J. exp. Zool.*, 63, 309-327.

Burns (R. K.) — 1935. — The process of sex transformation in parabiotic *Amblystoma*. III. Conversion of testis to ovary in heteroplastic pairs of *A. tigrinum* and *A. punctatum*. *Anat. Rec.*, 63, 101-129.

Burns (R. K.) — 1938. — The effects of crystalline sex-hormones on sex-differentiation in *Amblystoma*. I. Estrone. *Anat. Rec.*, 71, 447-467.

Burns (R. K.) — 1939 a. — The effects of crystalline sex-hormones on sex-differentiation in *Amblystoma*. II. Testosterone propionate. *Anat. Rec.*, 73, 73-93.

Burns (R. K.) — 1939 b. — The differentiation of sex in the Opossum (*Didelphys virginiana*) and its modification by the male hormone testosterone propionate. *J. Morph.*, 65, 79-119.

Burns (R. K.) — 1950. — Sex transformation in the Opossum : some new results and a retrospect. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 39, 467-481.

Burns (R. K.) — 1956. — Transformation du testicule embryonnaire de l'Opossum en ovotestis ou en « ovaire » sous l'action de l'hormone femelle, le dipropionate d'œstradiol. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 45, 173-202.

Burns (R. K.) — 1961. — Role of hormones in the differentiation of sex. *Sex and internal secretions*, I, 76-158. Baillière, Tindall et Cox, Londres.

Callan (H. G.) et Lloyd (L.) — 1960. — Lampbrush chromosomes of crested newts. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, B, 243, 135-219.

Certain (P.), Collenot (G.), Collenot (A.) et Ozon (R.) — 1964. — Mise en évidence biochimique et histochimique d'une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase dans le testicule du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *C. R. Soc. Biol.*, 158, 1040-1043.

Champy (C.) — 1913. — Recherches sur la spermatogenèse des Batraciens et les éléments accessoires du testicule. *Arch. Zool. exp. gén.*, 52, 13-304.

Chang (C. Y.) — 1953. — Parabiosis and gonad transplantation in *Xenopus laevis* Daudin. *J. exp. Zool.*, 123, 1-28.

Chang (C. Y.) — 1955. — Hormonal influences on sex differentiation in the toad, *Bufo americanus*. *Anat. Rec.*, 123, 467-486.

Chang (C. Y.) et Witschi (E.) — 1955 a. — Independence of adrenal hyperplasia and gonadal masculinization in the experimental adrenogenital syndrome in frogs. *Endocrinology*, 56, 597-605.

Chang (C. Y.) et Witschi (E.) — 1955 b. — Breeding of sex reversed males of *Xenopus laevis* Daudin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 89, 150-152.

Chang (C. Y.) et Witschi (E.) — 1956. — Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 93, 140-144.

Charniaux-Cotton (H.) — 1957. — Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* Pallas (Crustacé Amphipode). *Ann. Sci. Nat.*, 19, 411-560.

Charniaux-Cotton (H.) — 1964. — Contrôle endocrinien de la différenciation sexuelle chez les Crustacés Supérieurs. IV[e] Symposium d'Endocrinologie comparée, Paris, 1964. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, sous presse.

Chieffi (G.) — 1962. — Azione degli ormoni sessuali sul differenziamento dei sessi di *Triton cristatus carnifex*. *Acta Embr. Morph. Exp.*, 5, 125-126.

Chieffi (G.) et Botte (V.) — 1963 a. — Osservazioni istochimiche sull'attività della steroide-3 β-olo-deidrogenasi nell'interrenale e nelle gonadi di girini e adulti di *Rana esculenta*. *Riv. Istoch. norm. pat.*, 9, 172-174.

Chieffi (G.) et Botte (V.) — 1963 b. — Histochemical reaction for steroid-3 β-ol-dehydrogenase in the interrenal and the corpuscules of Stannius of *Anguilla anguilla* and *Conger conger*. *Nature*, 200, 793-794.

Chieffi (G.), Botte (V.) et Visca (T.) — 1963. — Attività steroide-3 β-olodeidrogenasica nell'interrenale di alcuni selacei. *Acta med. Romana*, 1, 1-9.

Christensen (K.) — 1929. — Hermaphroditism in *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, 43, 345-358.

Collenot (A.) — 1961. — Inversion expérimentale du sexe chez les mâles génétiques de l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. par le diéthylstilbœstrol. *C. R. Acad. Sc.*, 253, 2603-2605.

Collenot (A.) — 1964. — Mise en évidence histochimique d'une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase dans les gonades non différenciées et en cours de différenciation des mâles génétiques de l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. *C. R. Acad. Sc.*, 259, 2535-2537.

Collenot (G.) et Ozon (R.) — 1964. — Mises en évidence biochimique et histochimique d'une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde déshydrogénase dans le testicule de *Scylliorhinus canicula* L. *Bull. Soc. Zool. France*, 89, 577-587.

Colloques internationaux du Centre national de la recherche scientifique. La différenciation sexuelle chez les Vertébrés, 31, Paris, 5-12 Juin 1950. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 39, 1950.

Daniel (J. C.) — 1964. — Some effects of steroids on cleavage of rabbit eggs *in vitro*. *Endocrinology*, 75, 706-710.

Dantchakoff (V.) — 1935 a. — Sur l'inversion sexuelle de l'ébauche testiculaire chez l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 200, 1983.

Dantchakoff (V.) — 1935 b. — Sur les effets morphogénétiques de la folliculine dans l'ébauche testiculaire du Poulet. *C. R. Soc. Biol.*, 119, 1117-1120.

Dantchakoff (V.) — 1936. — Réalisation du sexe à volonté par inductions hormonales. I. Inversion du sexe dans un embryon génétiquement mâle. *Bull. Biol. France et Belgique*, 70, 241-307.

Deal (R. E.) — 1931. — The development of sex characters in the tree frogs. *Anat. Rec.*, 48, 27-45.

Della Corte (F.), Galgano (M.) et Cosenza (L.) — 1962. — Su alcune reazioni istochimiche per gli steroidi nel testicolo di *Triturus cristatus carnifex* (Laur.). *Arch. Zool. ital.*, 47, 353-363.

Dorfman (R. I.) — 1963. — Inhibitors of steroid actions and cholesterol and steroid biosynthesis. *Metabolite inhibitors*, I, 567-585. Academic Press, New-York.

Du Bois (A.-M.) et Beaumont (J. de) — 1927. — Intersexualité phénotypique dans la gonade mâle du triton. *C. R. Soc. Biol.*, 97, 1323-1324.

Emmens (C. W.) et Cox (R. I.) — 1958. — Dimethylstilbœstrol as an œstrogen inhibitor. *J. Endocrinol.*, 17, 265-271.

Emmens (C. W.), Cox (R. I.) et Martin (L.) — 1961. — Modification of the cellular response to œstrogens by antagonists. *Mem. Soc. Endocrin.*, 11, 134-143.

Emmens (C. W.), Cox (R. I.) et Martin (L.) — 1962. — Antiœstrogens. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 18, 415-466.

Emmens (C. W.), Cox (R. I.) et Martin (L.) — 1964. — Œstrogenic and antiœstrogenic activity of compounds related to diethylstilbœstrol. *Acta Endocrinol.*, 45, supplt. 90, 61-70.

Engel (L. L.) — 1959. — Mechanisms of action of estrogens. *Vit. and Horm.*, 17, 205-222.

Evans (T. C.) — 1931. — A case of sex reversal in *Rana pipiens*. *Anat. Rec.*, 48, 47-53.

Eversole (W. J.) et d'Angelo (S. A.). — 1943. — The effects of pregneninolone on the sexual development of *Rana pipiens*. *J. exp. Zool.*, 92, 215-227.

Farber (E.), Sternberg (W. H.) et Dunlap (C. E.) — 1956. — Histochemical localization of specific oxidative enzymes. I. Tetrazolium stains for diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.*, 4, 254-283.

Ferrari (R. A.) et Arnold (A.) — 1961. — Inhibition of β-hydroxysteroid dehydrogenase by steroids. *Federation Proc.*, 20, 284.

Ferrari (R. A.) et Arnold (A.) — 1963 a. — Inhibition of β-hydroxysteroid dehydrogenase. I. Structural characteristics of some steroidal inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 349-356.

Ferrari (R. A.) et Arnold (A.) — 1963 b. — Inhibition of β-hydroxysteroid dehydrogenase. II. Kinetics and pH effect. *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 357-364.

Foote (C. L.) — 1938. — Influence of sex-hormones on sex-differentiation in Amphibia (*Rana pipiens*). *Anat. Rec.*, 72, 120-121.

Foote (C. L.) — 1940. — Influence of sex-hormones on development and differentiation of gonads in *Amblystoma*. *Anat. Rec.*, 76, 88.

Foote (C. L.) — 1941. — Modification of sex-development in the marbled-salamander by administration of synthetic sex-hormones. *J. exp. Zool.*, 86, 291-319.

Foote (C. L.) — 1964. — Intersexuality in Amphibians. *Intersexuality in Vertebrates including Man*, 233-272. Academic Press, New-York.

Foote (C. L.) et Witschi (E.) — 1939. — Effects of sex-hormones on the gonads of frog larvae (*Rana clamitans*) : sex inversion in females, stability in males. *Anat. Rec.*, 75, 75-83.

Forbes (R. T.) — 1938. — Studies on the reproductive system of the Alligator. III. The action of testosterone on the accessory sex structures of recently hatched female Alligators. *Anat. Rec.*, 72, 87-97.

Gallien (L.) — 1937. — Action masculinisante du propionate de testostérone dans la différenciation du sexe chez *Rana temporaria* L. *C. R. Acad. Sc.*, 205, 375-377.

Gallien (L.) — 1938. — Action des hormones sexuelles dans la différenciation du sexe chez *Rana temporaria*. *Bull. Biol. France et Belgique*, 72, 269-296.

Gallien (L.) — 1940 a. — Recherches sur la physiologie hypophysaire dans ses relations avec les gonades et le cycle sexuel, chez la grenouille rousse, *Rana temporaria* L. *Bull. Biol. France et Belgique*, 74, 1-42.

Gallien (L.) — 1940 b. — Sur l'action amphisexuelle de la dihydrofolliculine dans la différenciation du sexe chez les Batraciens. *C. R. Acad. Sc.*, 211, 665-666.

Gallien (L.) — 1941. — Recherches expérimentales sur l'action amphisexuelle de l'hormone femelle (œstradiol) dans la différenciation du sexe chez *Rana temporaria* L. *Bull. Biol. France et Belgique*, 75, 369-397.

Gallien (L.) — 1944. — Recherches expérimentales sur l'organogenèse sexuelle chez les Batraciens Anoures. *Bull. Biol. France et Belgique*, 78, 257-359.

Gallien (L.) — 1948. — Action amphisexuelle de la prégnéninolone chez *Discoglossus pictus* Otth. *C. R. Acad. Sc.*, 227, 1418-1420.

Gallien (L.) — 1950 a. — Action du benzoate d'œstradiol dans la différenciation du sexe chez *Discoglossus pictus* Otth. *C. R. Acad. Sc.*, 230, 1006-1008.

Gallien (L.) — 1950 b. — Inversion du sexe (féminisation) chez l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah., traité par le benzoate d'œstradiol. *C. R. Acad. Sc.*, 231, 919-920.

Gallien (L.) — 1950 c. — Inversion du sexe et effet paradoxal (féminisation) chez l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah., traité par le propionate de testostérone. *C. R. Acad. Sc.*, 231, 1092-1094.

Gallien (L.) — 1950 d. — Etude de quelques facteurs intervenant dans l'action des hormones sexuelles au cours de la différenciation du sexe chez les Amphibiens Anoures. *Bull. Biol. France et Belgique*, 84, 341-375.

Gallien (L.) — 1950 e. — Les hormones sexuelles dans la différenciation du sexe chez les Amphibiens. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 39, 337-360.

Gallien (L.) — 1951. — L'éthinyl-testostérone a une action féminisante sur la gonade de *Pleurodeles waltlii* Michah. *C. R. Acad. Sc.*, 232, 2133-2135.

Gallien (L.) — 1952. — Elevage et comportement du Pleurodèle au Laboratoire. *Bull. Soc. Zool. France*, 77, 456-461.

Gallien (L.) — 1953. — Inversion totale du sexe chez *Xenopus laevis* Daud. à la suite d'un traitement gynogène par le benzoate d'œstradiol administré pendant la vie larvaire. *C. R. Acad. Sc.*, 237, 1565-1566.

Gallien (L.) — 1954 a. — Hormones sexuelles et différenciation du sexe chez les Amphibiens. *Rev. Suisse Zool.*, 61, 349-374.

Gallien (L.) — 1954 b. — Inversion expérimentale du sexe, sous l'action des hormones sexuelles, chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. Analyse des conséquences génétiques. *Bull. Biol. France et Belgique*, 88, 1-51.

Gallien (L.) — 1955. — Descendance unisexuée d'une femelle de *Xenopus laevis* Daud. ayant subi, pendant sa phase larvaire, l'action gynogène du benzoate d'œstradiol. *C. R. Acad. Sc.*, 240, 913-915.

Gallien (L.) — 1956. — Inversion expérimentale du sexe chez un Anoure inférieur *Xenopus laevis* Daudin. Analyse des conséquences génétiques. *Bull. Biol. France et Belgique*, 90, 163-183.

Gallien (L.) — 1959. — Analyse des effets des hormones stéroïdes dans la différenciation sexuelle des Amphibiens. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 48 bis, 83-100.

Gallien (L.) — 1961. — Double conversion du sexe chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *C. R. Acad. Sc.*, 252, 2768-2770.

Gallien (L.) — 1962 a. — Evolution chez le Triton *Pleurodeles waltlii* des intersexués obtenus après traitement par l'hormone femelle. *Bull. Biol. France et Belgique*, 96, 249-280.

Gallien (L.) — 1962 b. — Comparative activity of sexual steroids and genetic constitution in sexual differentiation of amphibian embryos. *Gen. Comp. Endocrin.*, supplt. 1, 346-355.

Gallien (L.) — 1963. — Différenciation sexuelle d'individus haploïdes du Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. mis en parabiose. Effets de compétition dans les associations ♀ 2 n : ♂ n . *C. R. Acad. Sc.*, 257, 2890-2893.

Gallien (L.) et Bidaud (O.) — 1959. — Table chronologique du développement chez *Triturus helveticus* Razoumowsky. *Bull. Soc. Zool. France*, 84, 22-32.

Gallien (L.), Certain (P.) et Ozon (R.) — 1964. — Mise en évidence d'une Δ^5-3 β-hydroxystéroïde-déshydrogénase dans le tissu interrénal de l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. aux divers stades du développement. *C. R. Acad. Sc.*, 258, 5729-5731.

Gallien (L.) et Collenot (A.) — 1958. — Inversion totale (féminisation) du sexe chez *Pelobates cultripes* Cuv. et féminisation partielle des gonades (intersexualité) chez *Pelodytes punctatus* Daud., à la suite d'un traitement gynogène par le benzoate d'œstradiol administré pendant la vie larvaire. *C. R. Acad. Sc.*, 247, 1042-1044.

Gallien (L.) et Collenot (A.) — 1960. — Inversion du phénotype sexuel (féminisation) chez *Triturus helveticus* Raz. et *Triturus alpestris* Laur., à la suite d'un traitement gynogène par le benzoate d'œstradiol administré pendant la vie larvaire. *C. R. Acad. Sc.*, 250, 926-928.

Gallien (L.) et Durocher (M.) — 1957. — Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltlii*. *Bull. Biol. France et Belgique*, 91, 97-114.

Gallien (L.) et Le Foulgoc (M.-T.) — 1958. — Activité œstrogène dans l'ovaire embryonnaire du Poulet. Vérification par le test biologique de la ratte castrée (Allen et Doisy) de l'identification chimique d'hormones stéroïdes œstrogènes dans l'ovaire gauche du Poulet de 21 jours. *C. R. Acad. Sc.*, 247, 1776-1778.

Gallien (L.) et Chalumeau-Le Foulgoc (M.-T.) — 1960. — Mise en évidence de stéroïdes œstrogènes dans l'ovaire juvénile de *Xenopus laevis* Daudin et cycle des œstrogènes au cours de la ponte. *C. R. Acad. Sc.*, 251, 460-462.

Garren (L. D.), Howell (R. R.) et Tomkins (G. M.) — 1964. — Mammalian enzyme induction by hydrocortisone : the possible role of RNA. *J. Mol. Biol.*, 9, 100-108.

Gavaudan (P.) — 1956. — Les facteurs de la cytonarcose. *Exposés actuels de Biologie cellulaire*, 275-361. Masson et Cie, Paris.

Glass (R.), Loring (J.), Spencer (J.) et Villee (C.) — 1961. — The estrogenic properties *in vitro* of diethylstilbœstrol and substances related to estradiol. *Endocrinology*, 68, 327-333.

Graham (M. A.) et Barr (M. L.) — 1959. — Sex chromatin in the Opossum, *Didelphys virginiana*. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 48 bis, 111-121.

Guyénot (E.) et Ponse (K.) — 1923. — Inversion expérimentale du type sexuel dans la gonade du Crapaud. *C. R. Soc. Biol.*, 89, 4-6.

Haffen (K.) — 1963. — Sur l'évolution, en greffes cœlomiques, du constituant cortical isolé des gonades femelles et intersexuées de l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 256, 3755-3758.

Hanaoka (K. I.) — 1939. — Influence of follicular hormone upon the sex differentiation in *Hynobius retardatus*. *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, 15, 265-268.

Hanaoka (K. I.) — 1941 a. — The effect of follicular hormone upon sex differentiation in *Hynobius retardatus*. *J. Fac. Sc., Hokkaido Imp. Univ.*, ser. VI, 7, 399-412.

Hanaoka (K. I.) — 1941 b. — The effect of testosterone propionate upon sex differentiation in *Hynobius retardatus*. *J. Fac. Sc., Hokkaido Imp. Univ.*, ser. VI, 7, 413-419.

Hertwig (R.) — 1912. — Über den derzeitigen Stand des Sexualitätsproblems. *Biol. Centralbl.*, 32, 1-45, 65-111 et 129-146.

Hertwig (R.) — 1921. — Uber den Einfluss der Uberreife der Eier auf das Geschlechtsverhältnis von Fröschen und Schmetterlingen. *Sitzungsber. Bayer. Akad. Wiss.*, 269-294.

Hitzeman (Sister J. W.) — 1962. — Development of enzyme activity in the Leydig cells of the mouse testis. *Anat. Rec.*, 143, 351-361.

Houillon (Ch.) — 1956. — Recherches expérimentales sur la dissociation médullo-corticale dans l'organogenèse des gonades chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *Bull. Biol. France et Belgique*, 90, 359-445.

Humphrey (R. R.) — 1928. — Sex differentiation in gonads developed from transplants of the intermediate mesoderm of *Amblystoma*. *Biol. Bull.*, 55, 317-338.

Humphrey (R. R.) — 1931. — Studies on sex reversal in *Amblystoma*. III. Transformation of the ovary of *A. tigrinum* into a functional testis through the influence of a testis resident in the same animal. *J. exp. Zool.*, 58, 333-366.

Humphrey (R. R.) — 1945. — Sex determination in ambystomid salamanders : a study of the progeny of females experimentally converted into males. *Am. J. Anat.*, 76, 33-66.

Humphrey (R. R.) — 1948. — Reversal of sex in females of genotype WW in the Axolotl (*Siredon* or *Amblystoma mexicanum*) and its bearing upon the role of the Z chromosome in the development of the testis. *J. exp. Zool.*, 109, 171-185.

Ichikawa (A.) — 1937. — Masculinization by testicular transplantation in spayed female *Triturus pyrrhogaster* with remarks on testis-ova and the modification of lateral-line organs. *J. Fac. Sc. Hokkaido Imp. Univ.*, ser. VI, 6, 71-86.

Iwasawa (H.) — 1955. — Transformation of ovaries to testes in thiourea treated frog larvae. *Endocrinol. Japon.*, 2, 263-268.

Iwasawa (H.) — 1957. — Effects of thiourea upon larval development of *Bufo vulgaris formosus*. *Zool. Magaz.*, 66, 19-21.

Iwasawa (H.) — 1958 a. — Effects of some steroid hormones on the gonads of *Rhacophorus* larvae. *J. Fac. Sc. Niigata Univ.*, ser. II, 2, 179-188.

Iwasawa (H.) — 1958 b. — Sex reversal in female tadpoles induced by the treatment with methylmercaptoimidazole. *Endocrinol. Japon.*, 5, 166-170.

Iwasawa (H.) — 1958 c. — Différenciation anormale de la gonade du têtard provoquée par l'injection de la gonadotrophine hypophysaire. *Zool. Magaz.*, 67, 24-26.

Iwasawa (H.) — 1961. — Effects of thyroidectomy, hypophysectomy and thiourea treatment on the development of gonads in frog larvae. *Japan. Journ. Zool.*, 13, 69-77.

Jost (A.) — 1943. — Action masculinisante de la prégnéninolone dans la différenciation du sexe de *Rana temporaria* L. *C. R. Soc. Biol.*, 137, 685-686.

Jost (A.), Chodkiewicz (M.) et Mauléon (P.) — 1963. — Intersexualité du fœtus de veau produite par des androgènes. Comparaison entre l'hormone fœtale responsable du free-martinisme et l'hormone testiculaire adulte. *C. R. Acad. Sc.*, 256, 274-276.

Kawamura (T.) et Yokota (R.) — 1959. — The offspring of sex-reversed females of *Rana japonica* Guenther. *J. Sc. Hiroshima Univ.*, B, 18, 31-38.

Kondo (K.) — 1959. — Breed differences in the response of the male reproductive organs of chicken embryos to estrogen. *J. Exp. Zool.*, 141, 1-14.

Kondo (K.) — 1963. — The effect of estrogen treatment on male embryos from reciprocal crosses between breeds of fowls with high and low response. *J. exp. Zool.*, 154, 329-337.

Kuschakewitsch (S.) — 1910. — Die Entwicklungsgeschichte der Keimdrüsen von *Rana esculenta*. Ein Beitrag zum Sexualitätsproblem. *Festschr. zum 60 Geb. R. Hertwig*, Bd. II, Jena, 63-225.

Levy (H.), Deane (H. W.) et Rubin (B. L.). — 1959. — Visualization of steroid-3 β-ol dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 65, 932-943.

Lillie (F. R.) — 1917. — The free-martin : a study of the action of sex hormones in the fetal life of cattle. *J. exp. Zool.*, 23, 371-452.

Marcus (P. I.) et Talalay (P.) — 1955. — On the molecular specificity of steroid-enzyme combinations. The kinetics of β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Proc. Roy. Soc.* (*London*), ser. B, 144, 116-132.

Meyns (R.) — 1910. — Ueber Froschhodentransplantation. *Arch. f. ges. Phys.*, 132, 433-493.

Mikamo (K.) et Witschi (E.) — 1963. — Functional sex-reversal in genetic females of *Xenopus laevis*, induced by implanted testes. *Genetics*, 48, 1411-1421.

Mintz (B.) — 1947. — Effects of testosterone propionate on sex development in female *Ambystoma* larvae. *Phys. Zool.*, 20, 355-373.

Mintz (B.) — 1948. — Testosterone propionate minimum for induction of male development in Anurans : comparative data from other vertebrates. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 69, 358-361.

Mintz (B.) et Foote (Fl.) — 1947. — Hormonal sex reversal in hypophysectomized Anuran larvae. *Anat. Rec.*, 99, 575.

Mintz (B.) et Gallien (L.) — 1951. — Etude comparative de l'action paradoxale (féminisation) du propionate de testostérone sur *Pleurodeles waltlii* Michah. normal et hypophysectomisé. *C. R. Soc. Biol.*, 145, 1793-1794.

Mintz (B.) et Gallien (L.) — 1954. — Androgen-induced feminization of urodele larvae in the absence of the hypophysis. *Anat. Rec.*, 119, 493-517.

Mintz (B.) et Witschi (E.) — 1946. — Determination of the threshold dose of testosterone propionate inducing testicular development in genetically female anurans. *Anat. Rec.*, 96, 30.

Moskowska (A.) — 1932. — Etudes endocrinologiques (testicule et hypophyse) chez le *Bombinator*. *Bull. Biol. France et Belgique*, 66, 501-552.

Naisse (J.) — 1963. — Détermination sexuelle chez *Lampyris noctiluca* L. (Insecte Coléoptère Malaciderme). *C. R. Acad. Sc.*, 256, 799-800.

Naisse (J.) — 1964. — Contrôle endocrinien de la différenciation sexuelle chez les Insectes. IV[e] Symposium d'Endocrinologie comparée, Paris, 1964. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, sous presse.

Narbaitz (R.) et Kolodny (L.) — 1964. — Δ^5-3 β-hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. *Z. Zellforsch.*, 63, 612-617.

Ozon (R.) — 1963. — Analyse, *in vivo*, du métabolisme des œstrogènes au cours de la différenciation sexuelle chez le Triton *Pleurodeles waltlii* Michah. *C. R. Acad. Sc.*, 257, 2332-2335.

Padoa (E.) — 1936. — Effeto paradossale (mascolinizzazione) sulla differenziazione sessuale di girini di *Rana esculenta* trattati con ormone follicolare. *Monit. Zool. Ital.*, 47, 285-289.

Padoa (E.) — 1942. — Il differenziamento del sesso invertito mediante la somministrazione di ormoni sessuali e corticosurrenali. Ricerche con diidrofollicolina, progesterone e acetato di desossicorticosterone, in *Rana esculenta*. *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 19, 185-223.

Padoa (E.) — 1950. — Grenouilles et Stérols. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 39, 314-333.

Pérez (Ch.) — 1903. — Sur la résorption phagocytaire des ovules chez les Tritons. *Ann. Inst. Pasteur*, 17, 617-630.

Pérez (Ch.) — 1904. — Résorption phagocytaire des spermatozoïdes chez les Tritons. *C. R. Soc. Biol.*, 56, 783-784.

Pesonen (S.) et Rapola (J.) — 1962. — Observations on the metabolism of adrenal and gonadal steroids in *Xenopus laevis* and *Bufo bufo*. *Gen. Comp. Endocrin.*, 2, 425-432.

Piquet (J.) — 1930. — Détermination du sexe chez les Batraciens en fonction de la température. *Rev. Suisse Zool.*, 37, 173-281.

Pisanò (A.) — 1951. — Gonadi e rene nelle larve di *Triturus cristatus* trattate con testosterone. *Riv. Biol.*, 43, 215-226.

Ponse (K.) — 1941. — La proportion sexuelle dans la descendance issue des œufs produits par l'organe de Bidder des Crapauds femelles. (Note préliminaire). *Rev. Suisse Zool.*, 48, 541-544.

Ponse (K.) — 1949. — La différenciation du sexe et l'intersexualité chez les Vertébrés. F. Rouge, Lausanne.

Price (D.), Ortiz (E.) et Deane (H. W.) — 1964. — The presence of Δ^5-3 β-hydroxysteroid dehydrogenase in fetal guinea pig testes and adrenal glands. *Am. Zool.*, 4, 327.

Puckett (W. O.) — 1939. — Some reactions of the gonads of *Rana catesbiana* tadpoles to injections of mammalian hormonal substances. *J. exp. Zool.*, 81, 43-65.

Puckett (W. O.) — 1940. — Some effects of crystalline sex hormones on the differentiation of the gonads of an undifferentiated race of *Rana catesbiana*. *J. exp. Zool.*, 84, 39-51.

Rapola (J.) — 1962. — Development of the amphibian adrenal cortex. *Ann. Acad. Sc. Fennicae*, 64, 1-81.

Raynaud (A.) — 1939. — Féminisation des embryons mâles de Souris par injection de diéthylstilbœstrol à la mère en gestation. *C. R. Soc. Biol.*, 131, 218-222.

Raynaud (A.) — 1959. — Quelques effets des hormones œstrogènes chez le fœtus de Souris. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 48 bis, 245-260.

Rickenbacher (J.) — 1961. — Über die Beeinflussung des Nukleinsäurestoffwechsels bei Amphibien — und Hühnerkeimen durch Sexualhormone. *Roux'Arch. Entw. Mech.*, 153, 419-433.

Risley (P. L.) — 1941. — A comparison of effects of gonadotropic and sex hormones on the urogenital systems of juvenile terrapins. *J. exp. Zool.*, 87, 477-515.

Rostand (J.) — 1950. — Essais de chimiotératogenèse chez les Batraciens anoures. *C. R. Soc. Biol.*, 144, 915-917.

Rubin (B. L.), Deane (H. W.) et Hamilton (J. A.) — 1963. — Biochemical and histochemical studies on Δ^5-3 β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the adrenal glands and ovaries of diverse mammals. *Endocrinology*, 73, 748-763.

Sabbadin (A.) — 1951. — Alcuni aspetti del differenziamento sessuale di una razza ben differenziata di *Rana esculenta*, in relazione con la teoria dei differenziatori sessuali. *Riv. Biol.*, 43, 107-127.

Salzgeber (B.) — 1957. — Influence de facteurs tératogènes sur l'évolution des organes sexués de l'embryon de Poulet. I. Action des facteurs physiques. II. Action des facteurs chimiques. *Bull. Biol. France et Belgique*, 91, 355-438.

Salzgeber (B.) — 1963 a. — Action féminisante de l'« Ypérite azotée » sur le testicule de l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 257, 754-755.

Salzgeber (B.) — 1963 b. — Production élective de la phocomélie sous l'influence d'Ypérite azotée. *J. Embryol. exp. Morph.*, 11, 413-429.

Salzgeber (B.) — 1964. — La genèse de la phocomélie : altérations observées dans les bourgeons de membres d'embryons de Poulet traités par l'« Ypérite azotée ». *C. R. Acad. Sc.*, 259, 2149-2151.

Samuels (L. T.), Helmreich (M. L.), Lasater (M. B.) et Reich (H.) — 1951 — An enzyme in endocrine tissues which oxidizes Δ^5-3 β-hydroxysteroids to α, β unsaturated ketones. *Science*, 113, 490-491.

Scheib (D.) — 1962. — Propriétés activantes des stéroïdes sur la phosphatase acide des canaux de Müller de l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 255, 772-774.

Segal (S. J.) — 1953. — Morphogenesis of the œstrogen induced hyperplasia of the adrenals in larval frogs. *Anat. Rec.*, 115, 205-230.

Stolkowski (J.) et Bellec (A.-M.) — 1960. — Influence du rapport K/Ca du milieu sur la distribution des sexes chez les têtards de *Discoglossus pictus* (Otth.) élevés en solution de Ringer. *C. R. Acad. Sc.*, 251, 1669-1671.

Swingle (W. W.) — 1926. — The germ cells of Anurans. II. *J. Morph.*, 41, 441-546.

Takahashi (H.) — 1957. — The malformed development of toad larvae treated with estradiol. *Annot. Zool. japon.*, 30, 199-203.

Takahashi (H.) — 1958 a. — Gonadal reaction in the tree frog larvae (*Hyla arborea japonica* Guenther) to the androgen. *J. Fac. Sc. Hokkaido Univ.*, ser. VI, 14, 92-99.

TAKAHASHI (H.) — 1958 b. — Time relation between the administration of estradiol and the occurrence of abnormalities in limbs and gonads of frog larvae. *J. Fac. Sc. Hokkaido Univ.*, ser. VI, 14, 100-110.

TAKAHASHI (H.) — 1959. — Partial feminization of larval gonads of *Hyla arborea japonica* Guenther induced by treatment with estradiol. *J. Fac. Sc. Hokkaido Univ.*, 14, 210-221.

TALALAY (P.) et MARCUS (P. I.) — 1956. — Specificity, kinetics and inhibition of α-and β-hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, 218, 675-691.

TOMKINS (G. M.) et MAXWELL (E. S.) — 1963. — Some aspects of steroid hormone action. *Ann. Rev. Biochem.*, 32, 677-708.

TÖNDURY (G.) et CAGIANUT (B.) — 1951. — Zur Wirkung der Sexualhormone auf Wachstum und Differenzierung. *Biol. Rev.*, 26, 28-58.

TRAMU (Y.) — 1958. — Recherches sur la différenciation sexuelle chez *Triturus alpestris* Laurenti. Diplôme d'Etudes Supérieures. Faculté des Sciences. Paris.

TSCHUMI (P.) — 1954. — Konkurrenz bedingte Rückbildungen der Hinterextremität von *Xenopus* nach Behandlung mit einem Chloraethylamin. *Rev. Suisse Zool.*, 61, 177-270.

TSCHUMI (P.) — 1964. — Die Evolution der Gliedmassen in entwicklungsphysiologischer Perspektive. *Rev. Suisse Zool.*, 71, 215-236.

UCHIDA (T.) — 1937. — Studies on the sexuality of Amphibia. III. Sex-transformation in *Hynobius retardatus* by the function of high temperature. *J. Fac. Sc., Hokkaido Imp. Univ.*, ser. VI, 6, 59-70.

UCHIDA (T.) et HANAOKA (K. I.) — 1949. — The occurrence of oviform germ cells by hormonal injection in the regenerated testes of a newt. *Cytologia*, 15, 109-130.

VANDENHENDE (J.) — 1958. — Recherches sur la différenciation sexuelle chez *Pelobates cultripes* Cuvier. Diplôme d'Etudes Supérieures. Faculté des Sciences. Paris.

VANNINI (E.) — 1938. — Sviluppo delle gonadi e intersessualita transitoria in *Rana agilis* Thom. *Arch. Zool. ital.*, 25, 41-83.

VANNINI (E.) — 1941. — Rapida azione mascolinizzante del testosterone sulla gonadi di girini di *Rana agiiis* in metamorfosi. *Rend. C. Accad. Ital.*, ser. 7, 2, 666-676.

VANNINI (E.) — 1942. — Differenziamento sessuale, comportamento degli elementi germinativi e comparsa di cellule a sessualità intermedia in una razza indifferenziata di *Rana agilis*. *Arch. Zool. ital.*, 30, 363-414.

VANNINI (E.) — 1945. — Azioni del desossicorticosterone e del progesterone sul differenziamento delle gonadi nei girini di *Rana*. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 20, 718-720.

VANNINI (E.) — 1947. — Sviluppo e differenziamenta delle gonadi nei girini di *Bombina pachypus*. *Arch. Zool. ital.*, 31, 173-188.

VANNINI (E.) — 1948. — Confronto fra le azione mascolinizzanti del progesterone e del testosterone sulle gonadi di girini di *Rana agilis*. *Arch. Zool. ital.*, 33, 333-376.

VANNINI (E.) — 1950 a. — Azioni del desossicorticosterone sullo sviluppo delle gonadi in girini di *Rana dalmatina*. *Arch. Zool. ital.*, 35, 1-66.

VANNINI (E.) — 1950 b. — Organogenèse des gonades et déterminisme du sexe chez les Amphibiens et les Amniotes. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 39, 295-313.

VANNINI (E.) et BUSETTO (I.) — 1945. — Origine interrenale del tessuto midollare della gonada e sviluppo dell'organo di Bidder nel *Bufo bufo* L. e nel *Bufo viridis* Laur. *Atti Ist. Veneto Sc. Lett. Arti*, 104, 631-680.

VILLEE (C. A.) — 1962. — The role of steroid hormones in the control of metabolic activity. *The molecular control of cellular activity*, 297-318. J. M. Allen édit., Mc Graw-Hill Book Cpy, New-York.

Villee (C. A.) et Hagerman (D. D.) — 1961. — A mechanism of action for estrogenic steroid hormones. *Mechanism of action of steroid hormones*, 169-181. C. A. Villee et L. L. Engel, édit., Pergamon Press, Londres.

Vivien (J. H.) et Stéfan (Y.) — 1958. — Féminisation des gonades de jeunes Tortues d'eau *Emys leprosa*, mâles, par action du diéthylstilbœstrol. *C. R. Soc. Biol.*, 152, 649-652.

Wattenberg (L. W.) — 1958. — Microscopic histochemical demonstration of steroid-3 β-ol dehydrogenase in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 6, 225-232.

Weiler (C.) et Ohno (S.) — 1962. — Cytological confirmation of female heterogamety in the african water frog (*Xenopus laevis*). *Cytogenetics*, 1, 217-223.

Weissmann (G.) et Thomas (L.) — 1964. — The effects of corticosteroids upon connective tissue and lysosomes. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 20, 215-239.

Welti (E.) — 1928. — Evolution des greffes de glandes génitales chez le Crapaud (*Bufo vulgaris*). Auto-, homo-, hétérogreffes. *Rev. Suisse Zool.*, 35, 75-200.

Williams-Ashman (H. G.), Liao (S.), Hancock (R. L.), Jurkowitz (L.) et Silverman (D. A.) — 1964. — Testicular hormones and the synthesis of ribonucleic acids and proteins in the prostate gland. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 20, 247-292.

Willier (B. H.), Gallagher (T. F.) et Koch (F. C.) — 1935. — Sex-modification in the chick embryo resulting from injections of male and female hormones. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 21, 625-631.

Willmer (E. N.) — 1961. — Steroids and cell surfaces. *Biol. Rev.*, 36, 368-398.

Witschi (E.) — 1914. — Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Keimdrüsen von *Rana temporaria*. *Arch. Mikr. Anat.*, 85, 9-113.

Witschi (E.) — 1923. — Ueber die genetische Konstitution der Froschzwitter. *Biol. Centralb.*, 43, 83-96.

Witschi (E.) — 1924. — Die Beweise für die Umwandlung weiblicher Jungfrösche in männliche nach uteriner Überreife der Eier. *Roux' Arch. Entw. Mech.*, 102, 168-183.

Witschi (E.) — 1929 a. — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. I. Development and sexual differentiation of the gonads of *Rana sylvatica*. *J. exp. Zool.*, 52, 235-266.

Witschi (E.) — 1929 b. — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. II. Sex reversal in female tadpoles of *Rana sylvatica* following the application of high temperature. *J. exp. Zool.*, 52, 267-292.

Witschi (E.) — 1929 c. — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. III. Rudimentary hermaphrodism and Y chromosome in *Rana temporaria*. *J. exp. Zool.*, 54, 157-223.

Witschi (E.) — 1931. — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. V. Range of the cortex-medulla antagonism in parabiotic twins of *Ranidae* and *Hylidae*. *J. exp. Zool.*, 58, 113-146.

Witschi (E.). — 1936. — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. VIII. Experiments on inductive inhibition of sex differentiation in parabiotic twins of Salamanders. *Anat. Rec.*, 66, 483-503.

Witschi (E.) — 1937. — Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. IX. Quantitative relationships in the induction of sex differentiation and the problem of sex reversal in parabiotic Salamanders. *J. exp. Zool.*, 75, 313-373.

Witschi (E.) — 1942. — Temperature factors in the development and the evolution of sex. *Biol. Symp.*, 6, 51-70.

Witschi (E.) — 1948. — Geschlechtsbestimmung durch Chemikalien. *Arch. Julius Klaus-Stiftung*, 23, 524-538.
Witschi (E.) — 1950. — Génétique et physiologie de la différenciation du sexe. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.*, 39, 215-240.
Witschi (E.) — 1951 a. — Adrenal hyperplasia in larval frogs treated with natural œstrogens. *Anat. Rec.*, 111, 35-36.
Witschi (E.) — 1951 b. — Hormonale modifikation der Geschlechtsdifferenzierung bei *Alytes obstetricans*. *Zeitschr. f. Naturforsch.*, 6, 76-85.
Witschi (E.) et Allison (J. E.) — 1950. — Responses of *Xenopus* and *Alytes* to the administration of some steroid hormones. *Anat. Rec.*, 108, 589-590.
Witschi (E.), Bruner (J. A.) et Segal (S. J.) — 1953. — The pluripotentiality of the mesonephric blastema. *Anat. Rec.*, 115, 381.
Witschi (E.) et Chang (C. Y.) — 1950. — Cortisone-induced transformation of ovaries into testes in larval frogs. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 75, 715-718.
Witschi (E.) et Crown (E. N.) — 1937. — Hormones and sex determination in Fishes and in Frogs. *Anat. Rec.*, 70, 121-122.
Witschi (E.) et Dale (E.) — 1962. — Steroid hormones at early developmental stages of Vertebrates. *Gen. Comp. Endocrin.*, supplt. 1, 356-361.
Witschi (E.), Foote (C. L.) et Chang (C. Y.) — 1958. — Modification of sex differentiation by steroid hormones in a tree frog, *Pseudacris nigrita triseriata* Wied. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 97, 196-197.
Witschi (E.), Gilbert (W.) et Andrew (G. O.) — 1931. — Sex of parabiotic twins of *Amblystoma maculatum* (Shaw). *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 29, 278-279.
Witschi (E.) et Mc Curdy (H. M.) — 1929. — The free-martin effect in experimental parabiotic twins of *Triturus torosus*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 26, 655-657.
Wolff (Et.) — 1936. — L'évolution, après l'éclosion, des Poulets mâles transformés en intersexués par l'hormone femelle injectée aux jeunes embryons. *Arch. Anat. Hist. Embryol.*, 23, 1-38.
Wolff (Et.) — 1939. — L'action du diéthylstilbœtrol sur les organes génitaux de l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sc.*, 208, 1532-1533.
Wolff (Et.) et Ginglinger (A.) — 1935. — Sur la transformation des Poulets mâles en intersexués par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *Arch. Anat. Hist. Embryol.*, 20, 219-278.
Wolff (Et.) et Kieny (M.) — 1962. — Mise en évidence par l'irradiation aux rayons X d'un phénomène de compétition entre les ébauches du tibia et du péroné chez l'embryon de Poulet. *Develop. Biol.*, 4, 197-213.
Wolff (Et.) et Salzgeber (B.) — 1949. — Sur un nouveau procédé permettant d'obtenir l'intersexualité expérimentale chez l'embryon d'Oiseau : l'irradiation des gonades embryonnaires à l'aide des rayons X. *C. R. Soc. Biol.*, 143, 532-533.
Yamamoto (T.) — 1953. — Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. exp. Zool.*, 123, 571-594.
Yamamoto (T.) — 1962. — Hormonic factors affecting gonadal sex differentiation in fish. *Gen. Comp. Endocrin.*, supplt. 1, 341-345.
Yamamoto (T.) — 1963. — Induction of reversal in sex differentiation of YY zygotes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics*, 48, 293-306.
Yielding (K. L.) et Tomkins (G. M.) — 1962. — Studies on the interaction of steroid hormones with glutamic dehydrogenase. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 18, 467-485.

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

L'emploi d'inhibiteurs du métabolisme (actinomycine et puromycine) dans l'analyse expérimentale des processus morphogénétiques

Vu et approuvé :
Paris, le 17 Février 1965.
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY.

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

Achevé d'imprimer le 27 Avril 1965.

M. Declume, Imprimeur, Lons-le-Saunier. — 226-65-200.
Avril 1965 « Dépôt légal 2e trimestre 1965 — N° 5627 ».

PLANCHES

PLANCHE I.

Effets somatiques des traitements par les hormones sexuelles chez les Anoures.

L'échelle des fig. 1, 2, 3, 5 et 6, est indiquée à la fig. 4.
L'échelle de la fig. 7 est indiquée à la fig. 8.
L'échelle des fig. 9, 10, 12, 13 et 14 est indiquée à la fig. 11.

Pelobates cultripes.

1. Membres antérieurs chez un témoin.
2. Membres antérieurs ectrodactyles chez un animal du lot Pba A_{57} DK_1 traité par le benzoate d'œstradiol.
3. Membres antérieurs clinodactyles chez un animal du lot Pba A_{57} DK_1 traité par le benzoate d'œstradiol.
4. Aspect de la jambe et du pied gauches chez un témoin.
5. Vue ventrale des membres postérieurs ectrodactyles d'un têtard non métamorphosé du lot Pba A_{57} DK_3, traité par le benzoate d'œstradiol.
6. Aspect du membre postérieur droit ectrodactyle chez un animal du lot Pba A_{57} EK_1, traité par le propionate de testostérone.

Pelodytes punctatus.

7. Vue ventrale des membres antérieurs chez un animal témoin.
8. Vue ventrale des membres antérieurs chez un animal du lot Pdy A_{57} EK_1 traité par le propionate de testostérone.

Bombina variegata.

9. Aspect du revêtement cutané dorsal chez un témoin à la métamorphose.
10. Aspect du revêtement cutané dorsal chez un animal non complètement métamorphosé du lot BO B_{56} EK_1 traité par le propionate de testostérone.
11. Vue ventrale du pied gauche chez un témoin du lot BO B_{56} T à la métamorphose.
12. Membre antérieur droit d'un témoin du lot BO B_{56} T à la métamorphose.
13. Membre antérieur droit d'un animal non complètement métamorphosé du lot BO B_{56} EK_1 traité par le propionate de testostérone. Noter la présence de plages kératinisées au niveau de l'avant-bras et de la face interne des deux premiers doigts.
14. Vue ventrale du pied gauche chez un animal non complètement métamorphosé du lot BO B_{56} EK_1 traité par le propionate de testostérone. Noter la présence d'une excroissance kératinisée à la base du premier orteil et la présence d'étuis kératinisés à l'extrémité des orteils.

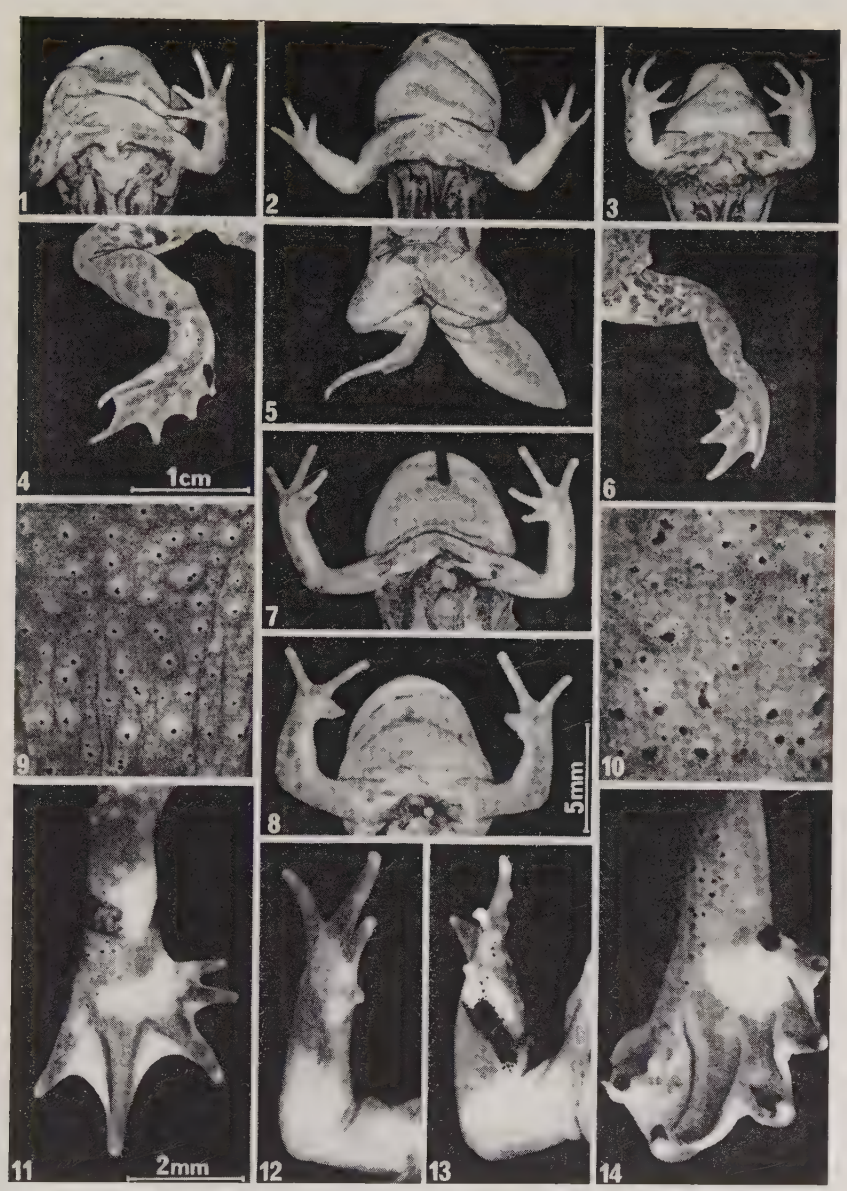
1
2
3
4
1cm
5
6
7
8
5mm
9
10
11
2mm
12
13
14

PLANCHE II

Action des hormones sexuelles sur l'appareil uro-génital de *Triturus alpestris*.

L'échelle des fig. 15, 16, 17 et 18 est indiquée à la fig. 19.

15. Aspect de l'appareil uro-génital chez une femelle témoin à la métamorphose. Les canaux de Müller (C. M.) sont visibles, les ovaires (Ov.) sont masqués partiellement par les corps adipeux (C.a.).

16. Aspect chez l'animal TA B_{57} $EK_2/3$ à la métamorphose après un traitement par le propionate de testostérone. Noter le développement important des canaux de Wolff (C. W.). La flèche indique sensiblement le niveau de la coupe histologique représentée fig. 63 (Pl. VII) ; uretères primaires et canaux de Müller sont accolés. Les gonades vestigiales sont masquées par les corps adipeux (C.a.).

17. Aspect chez la femelle TA C_{57} $EK_1/1$ à la métamorphose après un traitement par le propionate de testostérone. Seuls les uretères primaires (U.p.) sont présents au niveau de l'espace dianéphrétique. La flèche souligne la présence des ostiums. Les ovaires sont masqués par les corps adipeux. Remarquer le développement particulièrement net du cloaque (Cl.) ainsi que chez les animaux des fig. 16 et 18.

18. Aspect chez la femelle TA B_{57} $EK_2/6$ à la métamorphose après un traitement par le propionate de testostérone. Les canaux de Wolff (C. W.) sont dilatés.

19. Aspect chez l'animal TA B_{57} $EK_2/5$ après un traitement par le propionate de testostérone. L'ascite a provoqué un retard du développement (noter la minceur de la paroi abdominale). Le mésonéphros dont la différenciation a été profondément inhibée n'est représenté de chaque côté que par une dizaine de nodules au niveau des gonades vestigiales. Les uretères primaires (U.p.) sont maintenus au niveau de l'espace dianéphrétique.

20. Aspect chez la femelle TA C_{57} DK_3/D à la métamorphose traitée par le benzoate d'œstradiol. Un canal de Müller (C. M.) dilaté est présent sur le côté gauche, il est absent sur le côté droit où l'on devine l'uretère primaire (U.p.). La flèche souligne la présence d'une boursouflure à la surface du mésonéphros.

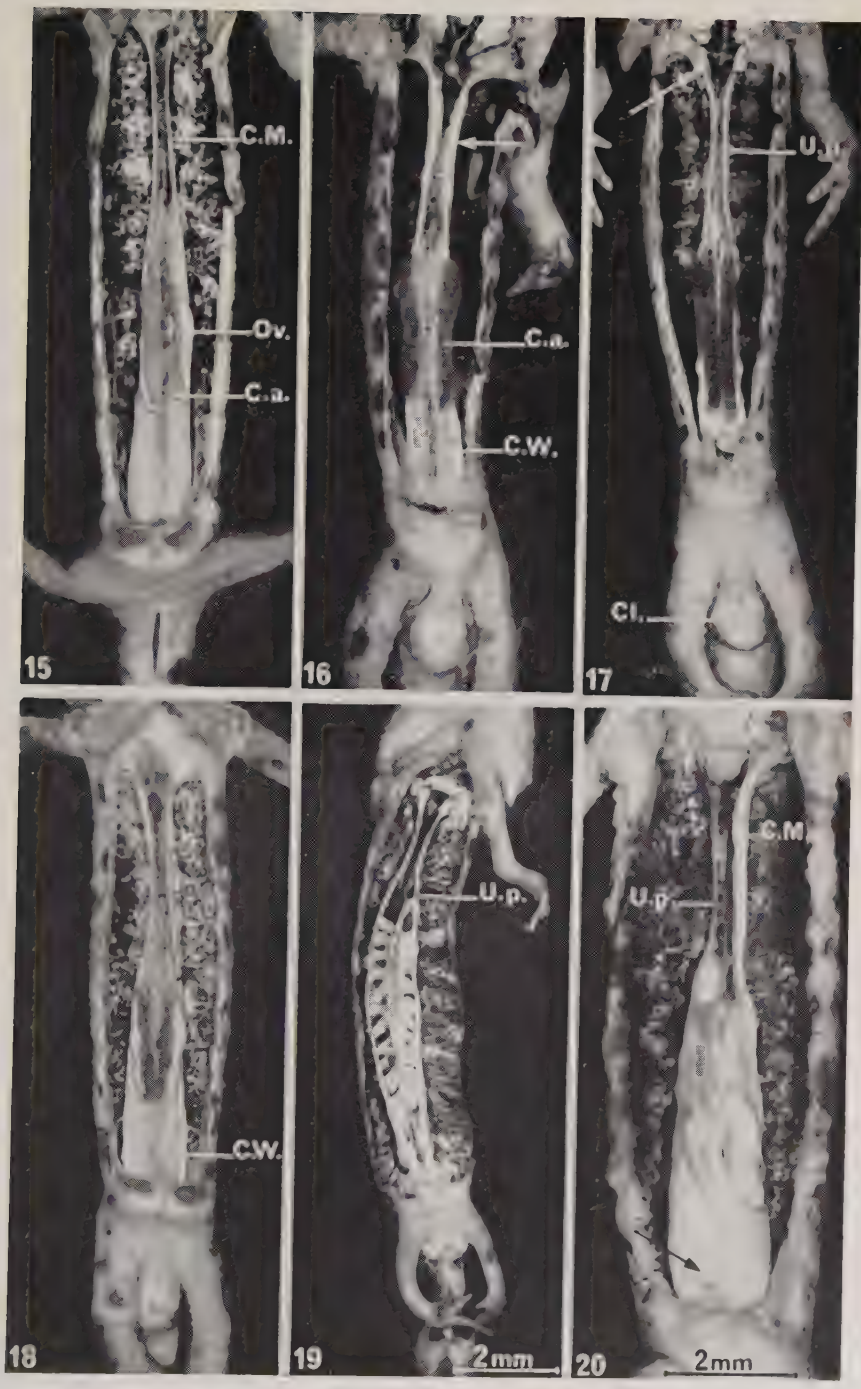
C.M.
Ov.
C.a.
15
C.a.
C.W.
16
U.p.
Cl.
17
C.W.
18
U.p.
19
2mm
C.M.
U.p.
20
2mm

PLANCHE III.

Gonades normales et intersexuées chez *Pelodytes punctatus*.

L'échelle des fig. 21 et 22 est indiquée à la fig. 23.

L'échelle des fig. 24, 25, 27, 28 et 29 est indiquée à la fig. 26.

Chez la plupart des animaux, les corps adipeux ont été reséqués dans le but de faciliter l'observation des gonades.

21. Testicules d'un mâle témoin à la métamorphose.

22. Ovaires d'une femelle témoin à la métamorphose.

23. Gonades à la métamorphose d'un animal intersexué du lot Pdy A_{57} DK_1 traité par le benzoate d'œstradiol. Forme particulière des gonades où du pigment se devine en profondeur.

24. Gonades à la métamorphose d'un animal intersexué du lot Pdy A_{57} DK_8 traité par le benzoate d'œstradiol. Dilatation des canaux de Müller (C. M.) seulement dans leur portion la plus antérieure.

25. Ovaires d'une femelle du lot Pdy A_{57} DK_1, 1 mois après la métamorphose, à la suite d'un traitement pendant la vie larvaire et de l'injection de benzoate d'œstradiol. Développement important et asymétrique des canaux de Müller.

26. Gonades d'un animal intersexué du lot Pdy A_{57} DK_1, 1 mois après la métamorphose, à la suite d'un traitement pendant la vie larvaire et de l'injection de benzoate d'œstradiol.

27. Testicules d'un mâle témoin, 2 mois après la métamorphose. Les canaux de Müller (C. M.) sont visibles.

28. Ovaires d'une femelle témoin, 2 mois après la métamorphose.

29. Gonades d'un animal intersexué du lot Pdy A_{57} DK_1, 2 mois après la métamorphose, à la suite d'un traitement pendant la vie larvaire et de l'injection de benzoate d'œstradiol. Comparer les canaux de Müller (C. M.) très dilatés à ceux des témoins mâle et femelle de même âge (fig. 27 et 28).

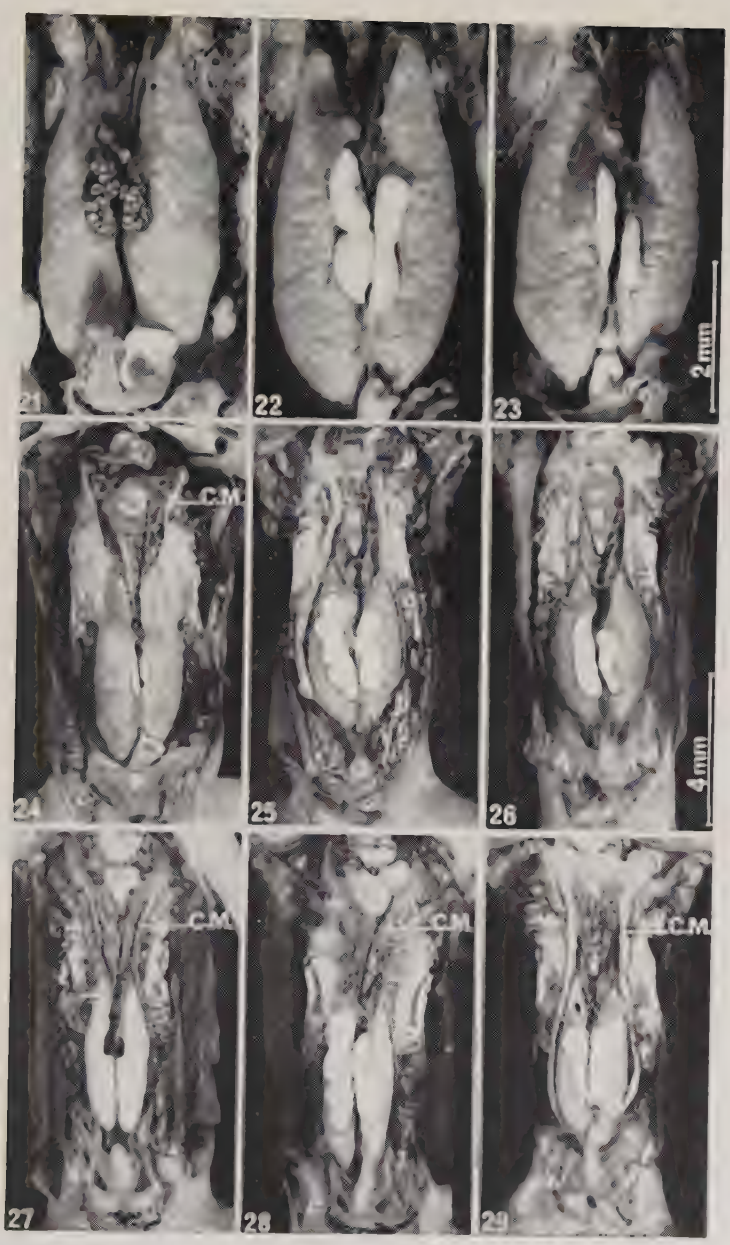
21
22
23
2mm
C.M.
24
25
26
4mm
C.M.
C.M.
C.M.
27
28
29

PLANCHE V.

Gonades normales et intersexuées chez *Triturus alpestris*.

L'échelle des fig. 39 à 46 est indiquée à la fig. 47.

Chez la plupart des animaux, les corps adipeux ont été reséqués dans le but de faciliter l'observation des gonades.

39. Testicules chez un mâle témoin, âgé de 12 mois, du lot A_{61} T.

40. Ovaires chez une femelle témoin, âgée de 12 mois, du lot A_{61} T. Comparer les canaux de Müller (C. M.) à ceux du mâle de la fig. 39.

41. Gonades de l'animal intersexué TA B_{61} DK_1/A, traité par le benzoate d'œstradiol et âgé de 14 mois.

42. Gonades de l'animal intersexué TA A_{61} DK_1/C, traité par le benzoate d'œstradiol et âgé de 12 mois. Nombreux ovocytes visibles sur la face interne des deux gonades et disposition, selon le type femelle, des canaux collecteurs du rein (C. c.).

43. Gonades de l'animal intersexué TA B_{61} DK_1/D, traité par le benzoate d'œstradiol et âgé de 14 mois. Remarquer l'allongement des gonades et la présence, soulignée par la flèche, de quelques ovocytes blanchâtres au niveau du hile de la gonade gauche.

44. Testicules chez un mâle témoin adulte. Les canaux de Müller (C. M.) sont très fins mais visibles.

45. Gonades de l'animal intersexué TA_{57} DK/4 âgé de 32 mois. Présence d'un nodule testiculaire à la partie antérieure de la gonade gauche. Noter l'existence du canal de Müller (C. M.) gauche.

46. Gonade gauche de l'animal intersexué TA_{57} DK/3. Présence du canal de Müller (C. M.) gauche bien développé ; la gonade droite et le canal de Müller droit ont été enlevés pour l'étude histologique.

47. Gonade droite de l'animal intersexué TA_{57} DK/1 .La flèche indique, à l'angle postéro-interne de la gonade, l'emplacement des ovocytes atrétiques. Le canal de Müller (C. M.) gauche est présent, il est peu développé mais plus large que chez le mâle témoin (comparer avec fig. 44).

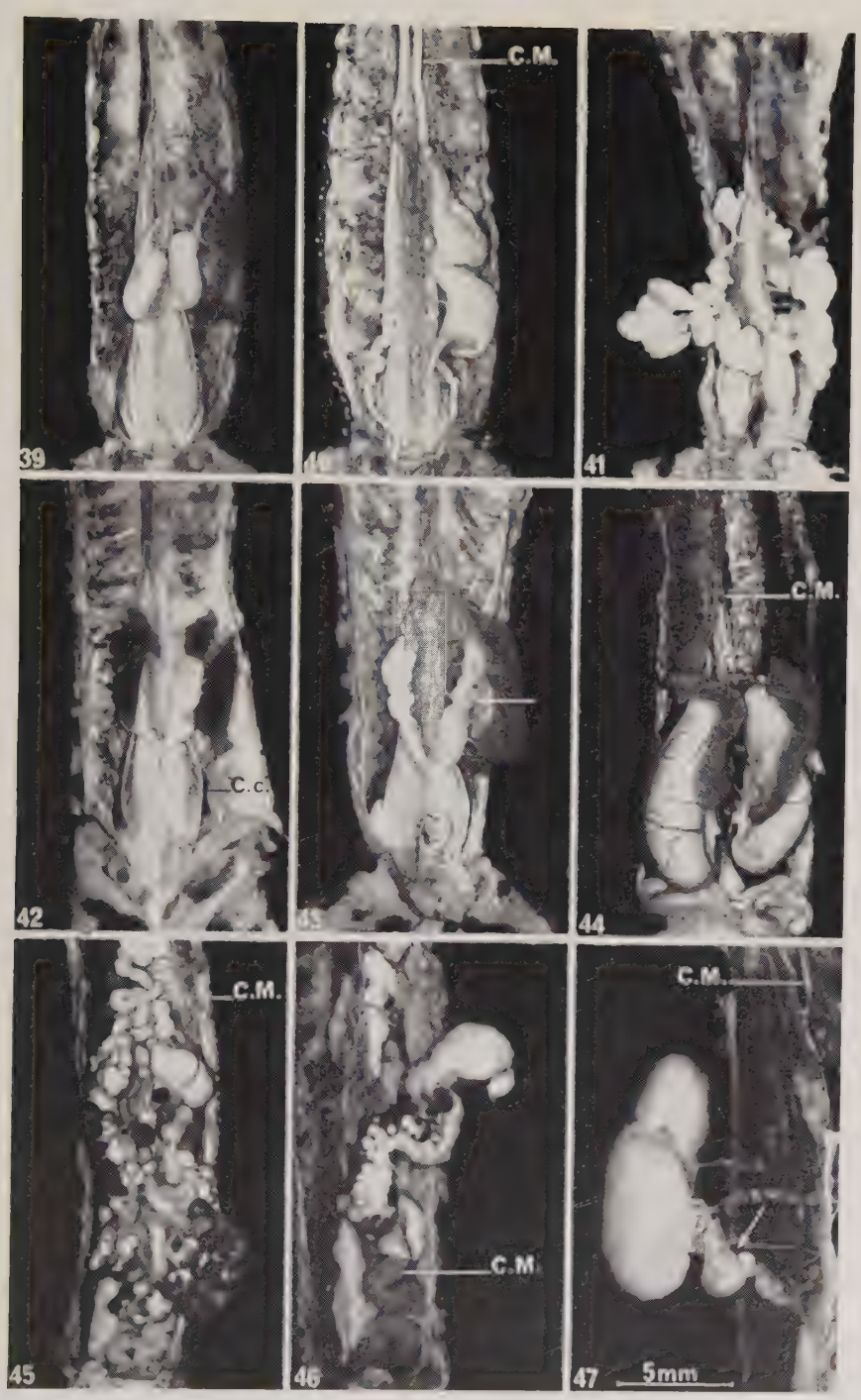
C.M.
39
41
C.c.
42
C.M.
44
C.M.
45
C.M.
46
C.M.
47
5mm

PLANCHE VI.

Pelodytes punctatus ; ORGANOGENÈSE DES GONADES ET INTERSEXUALITÉ APRÈS UN TRAITEMENT PAR LE BENZOATE D'ŒSTRADIOL.
(Coupes transversales).

L'échelle des fig. 48, 49, 50, 52, 55 et 57 est indiquée à la fig. 51.
L'échelle de la fig. 53 est indiquée à la fig. 54.

48. Ovaire d'une femelle témoin à la métamorphose. Noter la présence de pigment au niveau du hile de l'ovaire.

49. Testicule d'un mâle témoin à la métamorphose. Noter l'abondance du pigment qui suit les travées séparant les tubes séminifères.

50. Gonade intersexuée de l'animal Pdy A_{57} DK_3/B à la métamorphose. Présence d'une pellicule corticale séparée de la partie centrale médullaire (M.d.) par des travées conjonctives et des cellules pigmentaires. De nombreux gonocytes sont au repos dans la partie centrale.

51. Gonade intersexuée de l'animal Pdy A_{57} DK_1/N à la métamorphose. Des auxocytes sont présents dans le cortex et les travées conjonctives sont bien visibles.

52. Gonade intersexuée de l'animal Pdy A_{57} DK_3/K à la métamorphose.

53. Gonade indifférenciée au stade F. Toutes les cellules germinales sont contenues dans le cortex de la glande qui enveloppe la médulla très dense.

54. Gonade au stade G, au tout début de la différenciation mâle. Au centre de la glande des gonocytes sont mêlés à des cellules médullaires. A l'apex de la glande quelques gonocytes dont l'un effectue une mitose sont en position corticale, ailleurs le cortex est réduit à l'état d'une mince lame conjonctive sous laquelle se distinguent des mélanophores.

55. Gonade au stade J au cours de la différenciation femelle. La cavité ovarienne se creuse aux dépens de la médulla (M.d.), le nombre des gonocytes a augmenté considérablement dans le cortex.

56. Gonade intersexuée de l'animal Pdy A_{57} DK_3/A à la métamorphose. Présence d'auxocytes, d'ovocytes synaptiques et de gonocytes au repos.

57. Gonade intersexuée de l'animal Pdy A_{57} DK_1/G fixé 2 mois après la métamorphose. Observer, dans la partie centrale de la glande, de nombreux gonocytes au repos séparés des auxocytes par des mélanophores.

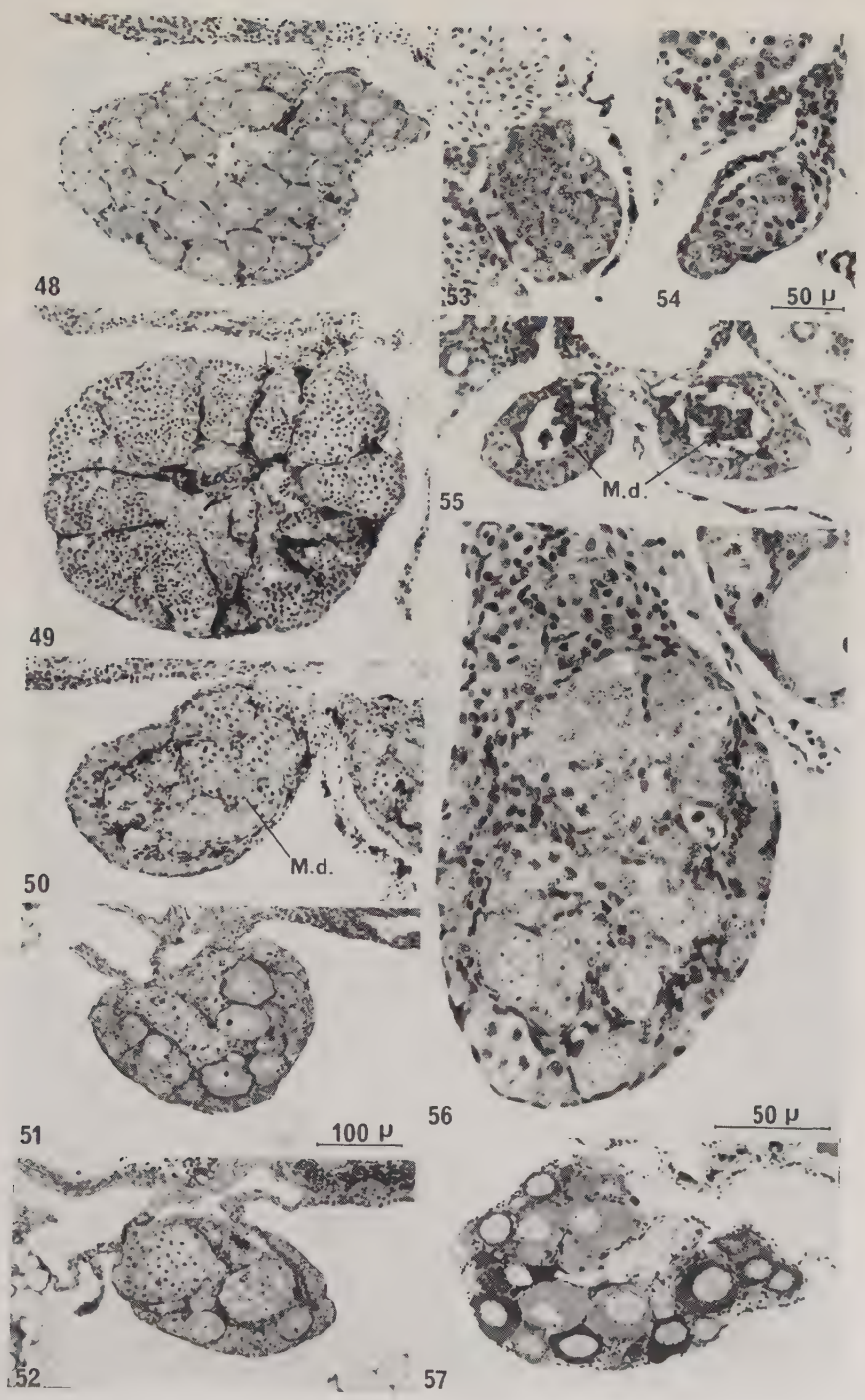
48
53
54
50 µ
49
55
M.d.
50
M.d.
56
51
100 µ
50 µ
52
57

PLANCHE VII.

ACTION DES HORMONES SEXUELLES AU NIVEAU DE L'APPAREIL UROGÉNITAL CHEZ LES URODÈLES ET LES ANOURES. (Coupes transversales).

L'échelle des fig. 59 et 60 est indiquée à la fig. 58.
L'échelle des fig. 61 et 62 est indiquée à la fig. 63.
L'échelle des fig. 64, 65, 67, 68 et 69 est indiquée à la fig. 66.

Triturus alpestris.

58. Ovaire, et rein correspondant, d'une femelle témoin TA_{57} T/A à la métamorphose, représentée fig. 15 (Pl. II). Présence du canal de Müller (C. M.) en cours de différenciation dans le lobe müllérien sur le côté du rein.
59. Gonade, et rein correspondant, chez un animal (TA A_{57} $DK_1/6$) à la métamorphose traité par le benzoate d'œstradiol. Présence d'ovocytes synaptiques dans la gonade intersexuée et absence complète de canal de Müller dans le lobe müllérien (L.m.). Observer la dilatation des tubules mésonéphrétiques, la présence de matériel éosinophile homogène dans certains d'entre eux ainsi que la présence de nombreuses granulations éosinophiles dans le vaisseau sanguin entourant ces tubules.
60. Gonade, et rein correspondant, chez un animal (TA C_{57} DK_3/C) à la métamorphose traité par le benzoate d'œstradiol. Noter l'absence de canal de Müller, la désorganisation du mésonéphros et la présence de granulations éosinophiles dans les vaisseaux sanguins, le tissu conjonctif et la cavité ovarienne.
61. Coupe au niveau de l'espace dianéphrétique chez un mâle témoin à la métamorphose. Les canaux de Müller (C. M.) sont en cours de différenciation près des uretères primaires (U.p.).
62. Coupe au niveau de l'espace dianéphrétique de l'animal TA C_{57} DK_3/D à la métamorphose, traité par le benzoate d'œstradiol et représenté fig. 20 (Pl. II). Noter d'un côté le grand développement du canal de Müller (C. M.) et l'absence d'uretère primaire et, du côté opposé, l'uretère primaire en cours d'involution (U.p.) et l'absence de toute formation müllérienne. Relever en outre la présence de granulations éosinophiles dans l'aorte dorsale.
63. Coupe au niveau de l'espace dianéphrétique de l'animal TA B_{57} $EK_2/3$ à la métamorphose, traité par le propionate de testostérone et représenté fig. 16 (Pl. II). Développement important du canal de Müller (C. M.) et de l'uretère primaire (U.p.) représentés ici d'un seul côté.

Bombina variegata.

64. Ovaires d'une femelle témoin à la métamorphose (BO A_{56} T/10).
65. Testicule d'un mâle à la métamorphose (BO C_{56} $DK_1/1$) traité par le benzoate d'œstradiol. La structure des testicules est identique à celle observée chez des mâles témoins ou traités par le propionate de testostérone.

Pelodytes punctatus.

66. Partie antérieure du mésonéphros chez un mâle témoin fixé deux mois après la métamorphose (Pdy A_{57} T/F). A ce niveau, le canal de Müller n'est pas encore différencié dans le lobe müllérien (L.m.).
67. Partie antérieure du mésonéphros chez un animal intersexué fixé deux mois après la métamorphose (Pdy A_{57} DK_3/E). Développement énorme du canal de Müller (C. M.) dont la paroi est constituée de cellules glandulaires à mucus.
68. Coupe en arrière de la partie postérieure du mésonéphros chez un mâle témoin (Pdy A_{57} T/R_2) à la métamorphose. Observer les canaux de Wolff (C. W.) aplatis, au-dessus du rectum.
69. Coupe en arrière de la partie postérieure du mésonéphros chez une femelle à la métamorphose (Pdy A_{57} EK_1/B) traitée par le propionate de testostérone. Comparer les canaux de Wolff (C. W.) dilatés à ceux de l'animal précédent.

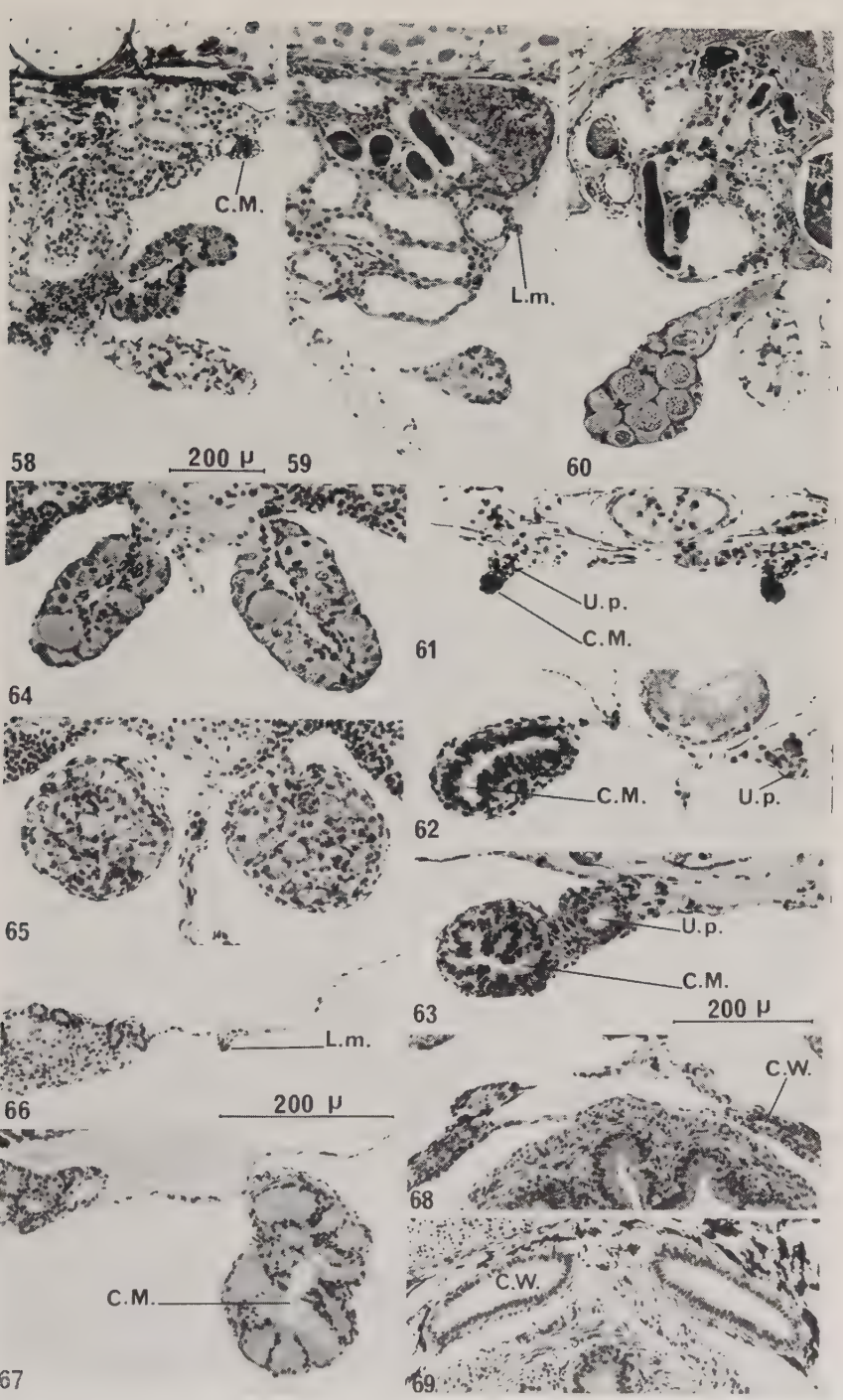
C.M.
L.m.
58
200 µ
59
60
U.p.
C.M.
61
64
C.M.
U.p.
62
65
U.p.
C.M.
63
200 µ
L.m.
C.W.
66
200 µ
68
C.M.
C.W.
67
69

PLANCHE VIII.

Etude histologique des gonades normales et intersexuées chez divers urodèles.

(Coupes transversales sauf fig. 81, 82 et 83, coupes sagittales).
L'échelle des fig. 70, 72 et 81 est indiquée à la fig. 71.
L'échelle des fig. 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 et 83 est indiquée à la fig. 80.

Triturus helveticus.

70. Testicule d'un mâle témoin à la métamorphose. Noter la répartition des spermatogonies dans la profondeur de la glande.
71. Ovaire d'un animal (T.H. D_{57} $DK_1/17$) à la métamorphose, traité par le benzoate d'œstradiol. Présence de granulations éosinophiles et d'hématies à l'intérieur de la cavité ovarienne (C.o.).
72. Ovaire d'un animal (T.H. B_{60} $EK_5/2$) à la métamorphose traité par le propionate de testostérone. Observer la présence de 2 gonocytes seulement dans le cortex de cette gonade vestigiale.

Salamandra salamandra.

73. Ovaire d'une femelle à la métamorphose (SA C_{62} DK_1/L) traitée par le benzoate d'œstradiol. Quelques ovogonies groupées en nids sont visibles dans le cortex ovarien.
74. Testicule d'un mâle témoin (SA A_{62} T/M_2) à la métamorphose.
75. Gonade d'un animal (SA A_{62} $DK_1/12$) traité par le benzoate d'œstradiol Noter l'épaisseur du cortex et la disposition particulière des noyaux cellulaires à ce niveau par rapport à ceux de la gonade de la figure précédente.
76. Gonade d'un animal (SA C_{62} DK_1/A) traité par le benzoate d'œstradiol. Présence de cellules germinales dont un nid d'ovogonies (Ov.) dans le cortex épaissi.
77. Gonade d'un animal (SA C_{62} DK_1/G) traité par le benzoate d'œstradiol montrant des gonies à la fois en position corticale et en position médullaire.

Triturus alpestris.

78. Testicule d'un mâle témoin TA_{57} T/B à la métamorphose.
79. Gonade intersexuée d'un animal (TA A_{57} $DK_1/7$) traité par le benzoate d'œstradiol. Présence d'ovocytes synaptiques et de gonocytes à noyaux plurilobés.
80. Coupe intéressant la partie la plus féminisée d'une gonade intersexuée de l'animal TA A_{57} $DK_1/9$ traité par le benzoate d'œstradiol. Observer les deux auxocytes et les gonocytes à noyaux plurilobés.
81. Gonade droite de l'animal intersexué TA_{57} DK/3 âgé de 32 mois. Présence d'un auxocyte à l'intérieur d'un cyste à spermatocytes et d'un autre, de plus grande taille, dans un cyste à spermatozoïdes.
82. Même gonade du même animal, au niveau d'un follicule en cours d'atrésie. Passage dans le cytoplasme granuleux de l'ovocyte, à droite, de macrophages provenant d'un vaisseau sanguin visible en haut à gauche.
83. Même gonade du même animal. Présence de deux auxocytes à l'intérieur d'un cyste contenant des spermatides.

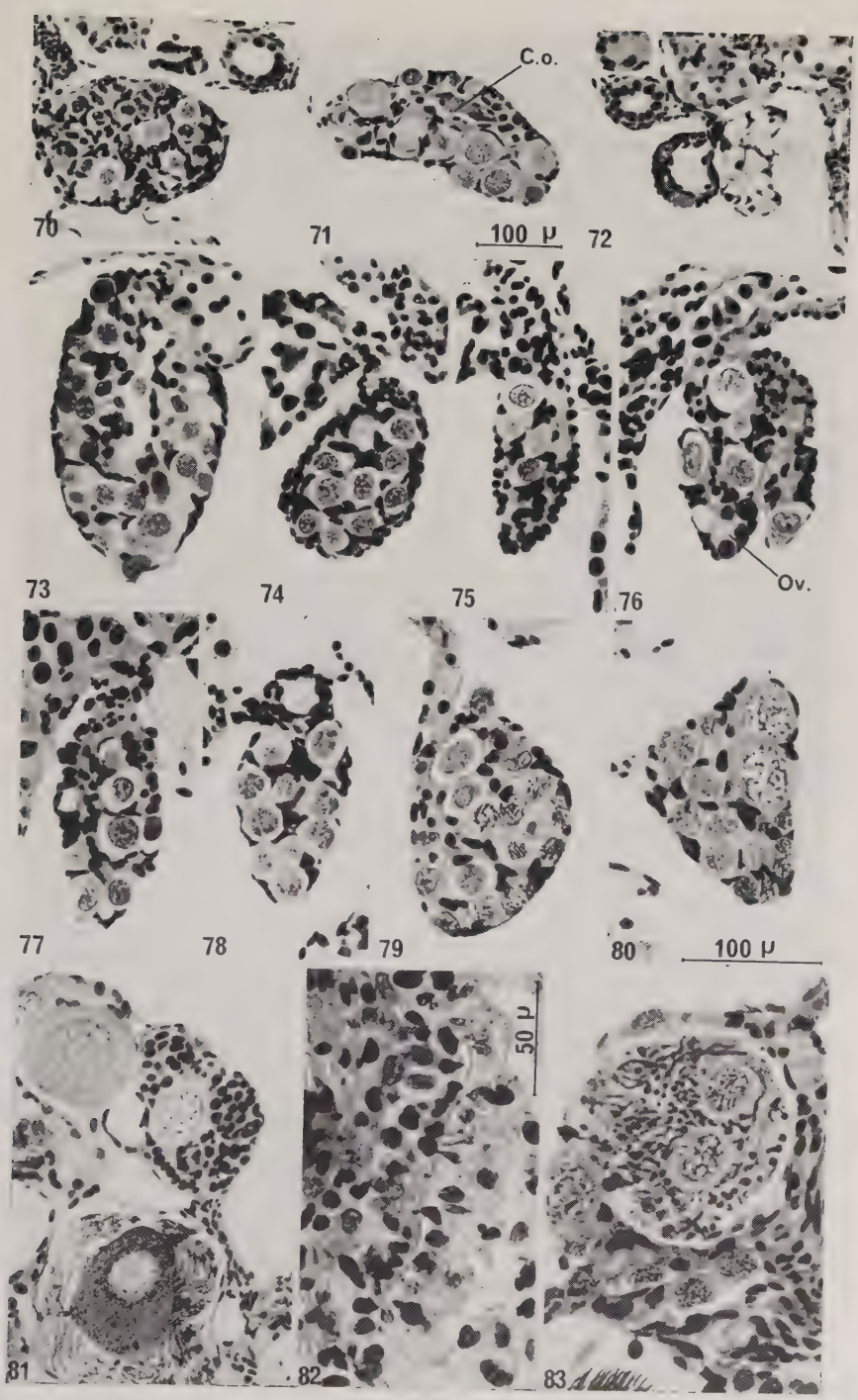
C.o.
70
71
100 µ
72
73
74
75
76
Ov.
77
78
79
80
100 µ
50 µ
81
82
83

PLANCHE IX.

ETUDE HISTOLOGIQUE DES GONADES NORMALES ET INTERSEXUÉES CHEZ *Pelobates cultripes*. (Coupes transversales).

L'échelle des fig. 85, 86, 88 et 90 est indiquée à la fig. 84.
L'échelle de la fig. 89 est indiquée à la fig. 91.

84. Ovaire d'une femelle témoin à la métamorphose.

85. Testicule d'un mâle témoin au même stade.

86. Ovaire d'un animal à la métamorphose (Pba B_{57} DK/6) traité par le benzoate d'œstradiol.

87. Portion agrandie de la coupe précédente. Observer, dans la paroi du sac ovarien, un amas (A.) de cellules germinales ayant l'aspect de spermatogonies.

88. Animal intersexué Pba C_{60} Stilb/14. Gonade droite, au niveau indique sur la fig. 34 (Pl. IV). Un nodule (N. d.) dont la structure est voisine de celle des canaux du *rete* est visible à l'intérieur de la languette ovarienne.

89. Même animal ; gonade gauche, au niveau indiqué sur la fig. 34 (Pl. IV). Noter la disposition centrale des canaux du *rete*, la spermatogenèse en cours dans les tubes séminifères et la pellicule d'ovocytes à l'apex de la gonade.

90. Animal intersexué Pba B_{57} DK/II, fixé à l'âge de 3 ans, gonade droite au niveau indiqué sur la figure 38 (Pl. IV). Observer l'écoulement du cytoplasme d'un ovocyte dans la lumière d'un canal du *rete testis* (C. R.), la présence de deux nodules (N. d.) isolés et le reploiement de l'albuginée (Al.) vers la profondeur du testicule.

91. Même animal. Coupe voisine de la précédente. Présence d'un ovocyte englobé par des éléments comparables aux canaux du *rete testis*.

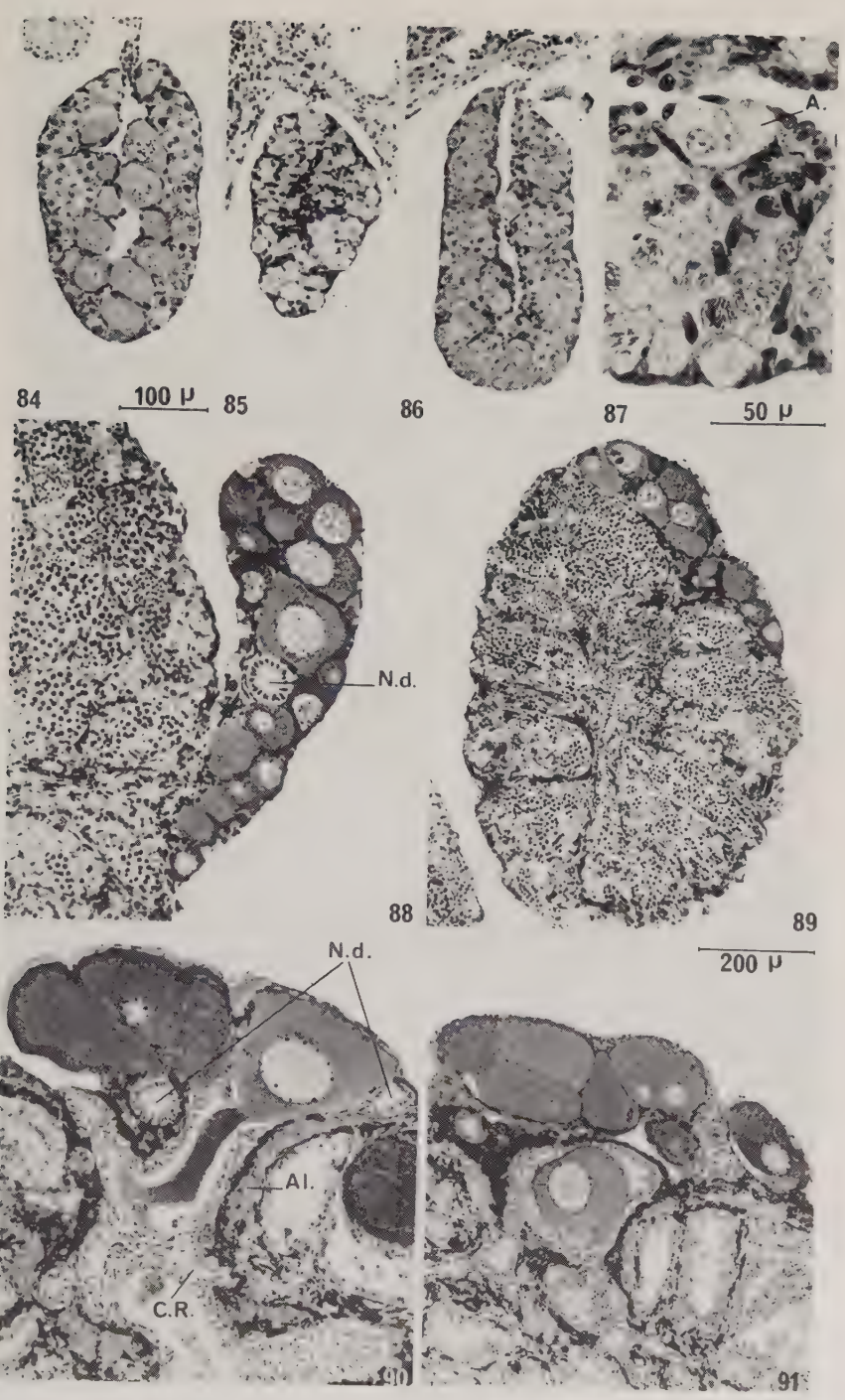
84
100 µ
85
86
A.
87
50 µ
N.d.
88
89
200 µ
N.d.
Al.
C.R.
90
91

PLANCHE X.

Mise en évidence histochimique d'une Δ^5-3β-hydroxystéroïde-déshydrogénase dans les gonades des mâles génétiques de *Pleurodeles waltlii* Michah. (Coupes transversales, sauf fig. 96 et 97, coupes sagittales).

(Ch., chorde ; G., gonade ; I., tissu interrénal ; T.g., tissu glandulaire).
L'échelle des fig. 92, 93, 96 et 97 est indiquée à la fig. 94.

92. Animal au stade 52. Cette coupe, colorée au glychémalun-éosine, permet d'observer la topographie des gonades moins facile à distinguer sur les figures 93 et 94 en raison de la technique utilisée.

93. Animal au stade 52. Dépôt de formazan dans le tissu interrénal et les gonades.

94. Animal au stade 52 traité par le benzoate d'œstradiol. Les flèches indiquent l'emplacement des gonades. Le formazan est présent seulement dans le tissu interrénal.

95. Animal au stade 52. Présence de grains de formazan à l'intérieur de la gonade.

96. Animal immature de 7 mois et demi, testicule. Les flèches indiquent les petits îlots où se dépose le formazan.

97. Animal mature de 10 mois, testicule. Dépôt abondant de formazan, au niveau du tissu glandulaire (T. g.), dans la paroi épaissie des cystes vidés.

Ch.
G.
92
Ch.
G.
93
Ch.
94
200 µ
G.
95
50 µ
T.g.
96
97

Printed in France.